

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO - UFES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE FIOLOGIA TRANSLACIONAL

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM SILDENAFIL SOBRE
CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS
HIPERCOLESTEROLÊMICOS

FRANCIANE PEREIRA BERNARDES

Vitória-ES
2015

FRANCIANE PEREIRA BERNARDES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM SILDENAFIL SOBRE
CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS
HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas da Universidade Federal do
Espírito Santo como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre
em Ciências Fisiológicas.**

**Orientadora: Profa. Dra. Silvana dos Santos
Meyrelles**

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória-ES, Dezembro de 2015.

Bernardes, Franciane Pereira.

Avaliação dos efeitos do tratamento com Sildenafil sobre células de medula óssea de camundongos hipercolesterolêmicos / Franciane Pereira Bernardes. – 2015.

89 f.

Orientador: Profa. Dra. Silvana dos Santos Meyrelles.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

1. Hipercolesterolemia. 2. Sildenafil. I. Meyrelles, Silvana dos Santos.
- II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde.
- III. Avaliação dos efeitos do tratamento com Sildenafil sobre células de medula óssea de camundongos hipercolesterolêmicos.

FRANCIANE PEREIRA BERNARDES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM SILDENAFIL SOBRE
CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS
HIPERCOLESTEROLÊMICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em ____ de Dezembro de 2015.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Silvana dos Santos Meyrelles.
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Avaliador Interno

Avaliador Externo

*Dedico a minha amada irmã Elaine, minha mãe Maríneth e ao
amor da minha vida, Diego Izoton.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste sonho.

Agradeço à professora Dr^a. Silvana dos Santos Meyrelles por ter aceitado me orientar e auxiliar nesta importante etapa da minha formação, por sua paciência e seu tempo dedicados à realização deste projeto.

Ao professor Dr. Elisardo Corral Vasquez por sua contribuição, seu auxílio e tempo disponibilizado durante o desenvolvimento do projeto.

À professora Dr^a. Maria do Carmo Pimentel Batitucci por sua contribuição, sua disponibilidade e atenciosidade no desenvolvimento dos protocolos do micronúcleo, à sua equipe de pesquisa por ter me recebido com muito carinho e atenciosidade.

À prof^a. Dr^a. Bianca Prandi Campagnaro por contribuir para o desenvolvimento e a concretização deste projeto e também para o meu aprendizado.

Ao prof. Dr. Breno Valentin Nogueira por sua disponibilidade e atenção e à sua equipe de pesquisa por terem me recebido muito bem.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) da UFES, especialmente à prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon, aos prof. Dr. Leonardo dos Santos e Dr. Marcelo Baldo por suas aulas maravilhosas. Com elas a Fisiologia Cardiovascular ficou mais linda e interessante.

Aos amigos do PPGCF pela parceria, integração e pelas brincadeiras de muito bom gosto, em especial à Girândia Brasil (é uma simpatia!), ao Fabrício Bragança (oh pessoa agradável, como pode!) e à Cleciane (vamos subir o conceito do programa! kkk), vocês são maravilhosos!

Obrigada aos professores Dr. Jones Bernardes Gracelli e Dr. Elisardo Corral Vasquez por terem aceitado avaliar minha aula de qualificação. Todas as sugestões foram de extrema importância e certamente irão contribuir para o curso de doutorado e para toda minha vida – não há limite para pesquisar e questionar.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Translacional (LFT) pelo apoio, companheirismo, parceria e amizade. Laís, Brunella, Jamila, Rossana, Camila, Markin, Flavia, Thanísia, Ananda, Brenna, Viviane, Isabela, Victor, Vinícios, João Victor, Eduardo; verdadeiramente vocês são maravilhosos! O carinho será eterno e as amizades serão mantidas. Foi um prazer trabalhar com vocês.

Alan, obrigada por tudo, suas explicações e sua paciência. Foi muito bom fazer parte da dupla Chris & Grag.

Ao meu amigo Jean Carlos Vencioneck Dutra, o meu muitíssimo obrigada. Você excedeu as expectativas do que se pode esperar de um amigo, com sua boa vontade e disponibilidade de sempre ajudar e se preocupar junto, e resolver junto. Você é espetacular, dogão.

Aos amigos da turma BioUfes 2008/2 que continuaram a participar dos bons e não tão bons momentos da UFES: Cléber Covre, Mainã Mantovanelli, Sarah Cantarino, Vinícius Santi e Lorena Xavier. Vocês me fazem muito bem!

À minha amada irmã Elaine Bernardes pela paciência e compreensão com a minha ausência, especialmente neste último ano.

Ao meu namorado Diego Izoton, por seu amor, apoio, carinho e companheirismo.

RESUMO

A hipercolesterolemia, além de ser um dos principais fatores que levam ao desenvolvimento da aterosclerose, provoca danos oxidativos e genotóxicos em células de medula óssea. O Sildenafil tem sido utilizado com sucesso em pesquisas cardiovasculares e, no caso da aterosclerose, demonstra efeitos positivos na diminuição do estresse oxidativo e de marcadores de danos genotóxicos em modelos experimentais de aterosclerose (camundongo *knockout* para a apolipoproteína E - apoE^{-/-}). Neste trabalho foi testada a hipótese de que o tratamento com Sildenafil seria capaz de melhorar possíveis danos que a hipercolesterolemia comprovadamente causa nas células de medula óssea de camundongos apoE^{-/-}. Foram utilizados camundongos machos com 03 meses de idade divididos em três grupos: controle C57BL/6 (C57), veículo (apoE^{-/-} V) e tratado (apoE^{-/-} S) os quais foram submetidos ao tratamento com Sildenafil 40mg/Kg/Dia ou Veículo por três semanas. Durante o período de tratamento foram feitas coletas de sangue periférico e no último dia de tratamento as células de medula óssea dos fêmures e tíbias foram isoladas e submetidas a protocolos de citometria de fluxo, dosagem de colesterol plasmático e teste do micronúcleo. O estresse oxidativo foi avaliado por meio da determinação dos níveis das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's) ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos ensaios de citometria de fluxo DHE e DCF, respectivamente. Foram adquiridas informações acerca das fases do ciclo celular das células de medula óssea por meio de marcação com Iodeto de Propídeo (PI) e a estimativa de danos genotóxicos e citotóxicos foi feita por meio do teste do micronúcleo de medula óssea e de sangue. Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida do *post hoc* de Fisher ou, quando cabível, ao teste *t* de *student* para amostras independentes e os resultados estão expressos como média \pm EPM e considerados estatisticamente significativos quando $*p < 0,05$. Os dados relativos às ERO's indicam que animais apoE^{-/-} V apresentam maiores níveis de ânion superóxido quando comparados ao grupo controle (C57) e ao grupo que recebeu Sildenafil (apoE^{-/-} V: 2217,6 \pm 361,0* *versus* C57: 1128,2 \pm 28,0 *versus* apoE^{-/-} S: 1125,7 \pm 190,8[#]). Os níveis de H_2O_2 também se apresentaram aumentados no grupo apoE^{-/-} V, com valores de 2847,0 \pm 191,0* *versus* C57:

2181,0±107,7 *versus* apoE^{-/-} S: 2107,0±80,60[#]. Quanto às características do ciclo celular, os valores obtidos apontaram para uma maior fragmentação de DNA nos animais do grupo veículo com relação ao controle e ao tratado (apoE^{-/-} V: 2,14±0,12* *versus* C57: 1,59±0,10 *versus* apoE^{-/-} S 1,31±0,11[#]). Também constatou-se no grupo veículo uma maior proporção de células de medula óssea no momento G₀/G₁ (apoE^{-/-} V: 75,45±0,70* *versus* C57: 68,60±0,53 *versus* apoE^{-/-} S: 67,75±1,60[#]). Além disso, os dados de micronúcleo sugerem que os animais hipercolesterolêmicos que não receberam tratamento com Sildenafil apresentam danos genotóxicos expressivos na medula (apoE^{-/-} V: 6,4±0,35* *versus* C57: 3,5±0,27 *versus* apoE^{-/-} S: 5,0±0,41[#]) e no sangue (apoE^{-/-} V: 7,6±0,80* *versus* C57: 4,0±0,37 *versus* apoE^{-/-} S: 3,95±0,40[#]) em comparação ao grupo tratado com Sildenafil. Em conjunto, os resultados indicam que o tratamento com Sildenafil em camundongos hipercolesterolêmicos foi capaz de produzir efeitos benéficos no ambiente medular demonstrados pela menor produção de ERO's, menor quantidade de DNA fragmentado e menor quantidade de células micronucleadas na medula óssea e no sangue periférico.

Palavras-chave: hipercolesterolemia, ERO'S, dano genotóxico, Sildenafil.

ABSTRACT

Hypercholesterolemia, besides being a major factor leading to the development of atherosclerosis, causes oxidative and genotoxic damage in bone marrow cells. Sildenafil has been used successfully in cardiovascular research and in the case of atherosclerosis, shows positive effects in the reduction of oxidative stress and the genotoxic damage markers of atherosclerosis in experimental models (Knockout mouse apolipoprotein E - apoE^{-/-}). In this study we tested the hypothesis that treatment with sildenafil would be able to improve the damage caused by the hypercholesterolemia on the bone marrow cells from apoE^{-/-} mice. Male mice were used at 03 months of age divided into three groups: C57BL/ 6 control (C57), vehicle (apoE^{-/-} V) and treated (apoE^{-/-} S) which were subjected to treatment with Sildenafil 40 mg/kg/Day or vehicle for three weeks. During the treatment period, peripheral blood samples were taken and on the last day of treatment the bone marrow cells from the femurs and tibias were isolated and subjected to flow cytometry protocols, dosage and serum cholesterol micronucleus test. Oxidative stress was evaluated by determining the levels of Reactive Oxygen Species (ROS) superoxide anion ($\cdot\text{O}_2^-$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) on cytometry flow assays DHE and DCF, respectively. Information has been obtained on the cell cycle phases of bone marrow cells by staining with propidium iodide (PI) and the estimation of genotoxic and cytotoxic damage was done through the micronucleus test of bone marrow and blood. Statistical analysis was performed using the one-way analysis of variance (ANOVA). When the ANOVA showed significant differences, the Fisher's test was performed as a *post hoc* analysis. When appropriate, the Student t test for independent samples was performed. The results are expressed as mean \pm SEM and the differences between means were considered statistically significant $p < 0.05$. Data on ROS indicate that apoE^{-/-} V animals had higher levels of superoxide anion compared with the control group (C57) and the group receiving Sildenafil (apoE^{-/-} V: $2217.6 \pm 361.0^*$ versus C57: 1128.2 ± 28.0 versus apoE^{-/-} S: $1125.7 \pm 190.8^\#$). Hydrogen peroxide levels also had increased in the group apoE^{-/-} V with values about $2847.0 \pm 191.0^*$ versus C57: 2181.0 ± 107.7 versus apoE^{-/-} S: $2107.0 \pm 80.60^\#$. Regarding the characteristics of the cell cycle, the values obtained indicate a

greater DNA fragmentation in the animals of vehicle group compared to the control and treated (apoE^{-/-} V: 2.14±0.12* *versus* C57: 1.59±0.10 *versus* apoE^{-/-} S 1.31±0.11[#]). It was also observed in the vehicle group had a greater proportion of bone marrow cells when G₀/G₁ (apoE^{-/-} V: 75.45±0.70* *versus* C57: 68.60±0.53 *versus* apoE^{-/-} S: 67.75±1.60[#]). Furthermore, the micronucleus data suggest that hypercholesterolemic animals receiving vehicle have significant genotoxic damage in the bone marrow (apoE^{-/-} V: 6.4±0.35* *versus* C57: 3.5±0.27 *versus* apoE^{-/-} S: 5.0±0.41[#]) and blood (apoE^{-/-} V: 7.6±0.80* *versus* C57: 4.0±0.37 *versus* apoE^{-/-} S: 3.95±0.40[#]) compared to the group treated with Sildenafil. Together, these results indicate that treatment with sildenafil in hypercholesterolemic mice was able to produce beneficial effects on the bone marrow environment demonstrated by a lower production of ROS, smaller amount of fragmented DNA and least amount of micronucleated cells in the bone marrow and peripheral blood.

Keywords: hypercholesterolemia, ROS, genotoxic damage, Sildenafil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processos biológicos e moléculas presentes na placa aterosclerótica.....	20
Figura 2 – Visão geral das principais fontes endógenas de EROs.....	24
Figura 3 – Estrutura da medula óssea e microambiente hematopoiético.....	26
Figura 4 – Vias de divisão celular das células-tronco adultas.....	27
Figura 5 – <i>Dot plot</i> típico de células totais de medula óssea.....	41
Figura 6 – Histograma típico representativo do ciclo celular obtido após marcação com PI.....	43
Figura 7 - Histograma típico de intensidade de fluorescência emitida por DHE.....	52
Figura 8– Histograma típico de intensidade de fluorescência emitida por DCF.....	53
Figura 9 – Histogramas típicos do ciclo celular obtidos pela marcação com PI em células de medula óssea nos diferentes grupos de estudo.....	56
Figura 10 – Microscopia óptica de EPC, ENC e EPC MN.....	60
Figura 11 – Microscopia óptica de ENC de sangue periférico.....	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Proporção de óbitos por doença isquêmica do coração.	19
Gráfico 2 – Proporção de óbitos por doença cerebrovascular.....	19
Gráfico 3 – Níveis de Colesterol Plasmático Total	49
Gráfico 4 – Níveis de Triglicerídeos Plasmáticos	49
Gráfico 5 – Número de células contadas na Câmara de Neubauer	50
Gráfico 6 – <i>Dot plot</i> das populações de células de medula óssea.	51
Gráfico 7 – Níveis de $\cdot\text{O}_2^-$ em células de medula óssea.....	53
Gráfico 8 – Níveis de H_2O_2 em células de medula óssea.....	54
Gráfico 9 – Quantidade de células na fase Sub- G_0	57
Gráfico 10 – Quantidade de células na fase G_0/G_1	58
Gráfico 11 – Percentual de Células na fase S do ciclo celular	59
Gráfico 12 – Percentual de Células na fase G_2/M do ciclo celular	59
Gráfico 13 – Frequência de EPC MN	61
Gráfico 14 – Relação de $\text{EPC}/(\text{EPC}+\text{ENC})$	62
Gráfico 15 – Quantidade de ENC MN de sangue periférico no início do tratamento/veículo (T_0).	64
Gráfico 16 – Quantidade de ENC MN de sangue periférico após 21 dias de tratamento (TF)	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados do Colesterol Total e Triglicerídeos plasmáticos.....	49
Tabela 2 - Frequência de EPC MN e Relação de EPC/(EPC+ENC).....	61
Tabela 3 - Frequência de ENC MN nos momentos T0 e TF.....	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACES

ANOVA: análise de variância

apoE: apolipoproteína E

apoE^{-/-}: Camundongo nocauteado para a apoE

CAT: catalase

DHE: Diidroetdeo

DCF: Diclorofluorescena

DCV: Doença cardiovascular

EPC: Eritrócito policromático

EPM: Erro Padrão da Média

ENC: Eritcito normocromtico

ERO's: Espécies Reativas de Oxigênio

GMPc: Monofosfato cíclico de guanosina

GPx: glutathiona peroxidase

ICAM: Molécula de adesão intercelular

IL: interleucina

MIF: Mediana de Intensidade de Fluorescência

MN: micronúcleo

PDE: fosfodiesterase

SOD: superóxido dismutase

VCAM: Molécula de adesão de célula vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Dados relevantes sobre a epidemiologia das Doenças Cardiovasculares	18
1.2	Aterosclerose	19
1.2.1	Aterosclerose Experimental	21
1.3	Espécies Reativas de Oxigênio	23
1.4	Importância da Medula óssea	25
1.5	Sildenafil	28
2	HIPÓTESE e JUSTIFICATIVA	33
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo Geral	35
3.2	Objetivos Específicos	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	Animais Experimentais	37
4.2	Coleta e Isolamento das células de medula óssea	38
4.3	Quantificação e Estimativa de Viabilidade Celular	39
4.4	Ensaio realizado por citometria de fluxo	40
4.4.1	Determinação dos Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	41
4.4.2	Análise do Ciclo Celular das células de medula óssea	42
4.5	Determinação dos Níveis de Colesterol Plasmático e Triglicerídeos	43
4.6	Teste do Micronúcleo	44
4.7	Análise Estatística	46
5	RESULTADOS	49
5.1	Colesterol Plasmático e Triglicerídeos	49
5.2	Quantificação e Viabilidade Celular	50
5.3	Dados obtidos por citometria de fluxo	51
5.3.1	Perfil das populações de células de medula óssea	51
5.3.2	Níveis de ERO's	52
5.3.3	Análise das fases do ciclo celular	55
5.4	Estimativa de Dano no material genético - Teste do Micronúcleo	59
5.4.1	Micronúcleo na Medula óssea	59
5.4.2	Micronúcleo no sangue	62

6 DISCUSSÃO	66
6.1 Colesterol Plasmático e Triglicerídeos	66
6.2 Níveis de ERO's	67
6.3 Análise das fases do ciclo celular	69
6.4 Estimativa de Dano no material genético - Teste do Micronúcleo	71
7 CONCLUSÃO	72
8 Limitações do Estudo	73

Introdução

1 INTRODUÇÃO

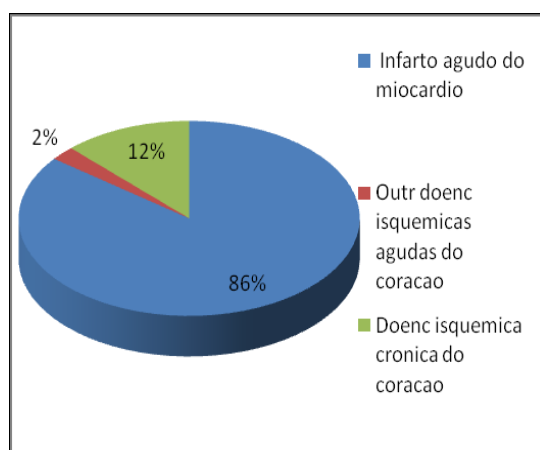
1.1 Dados relevantes sobre a epidemiologia das Doenças Cardiovasculares

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) as Doenças Cardiovasculares s) ainda são a principal causa de morte em todo o mundo. As DCV's são aquelas que afetam o coração e os vasos sanguíneos e incluem, por exemplo, o infarto, o acidente vascular cerebral (AVC), a aterosclerose, e também arritmias cardíacas, isquemias ou anginas. Segundo relatório da OMS do ano 2012, a doença isquêmica, o AVC, a doença pulmonar obstrutiva crônica e as infecções do trato respiratório inferior foram as quatro enfermidades que mais fizeram vítimas em ambos os sexos. No Brasil, as DCV's são responsáveis por cerca de 30% das mortes registradas no País ao ano, das quais, mais de 308 mil ocorreram por infarto e acidente vascular cerebral (AVC).

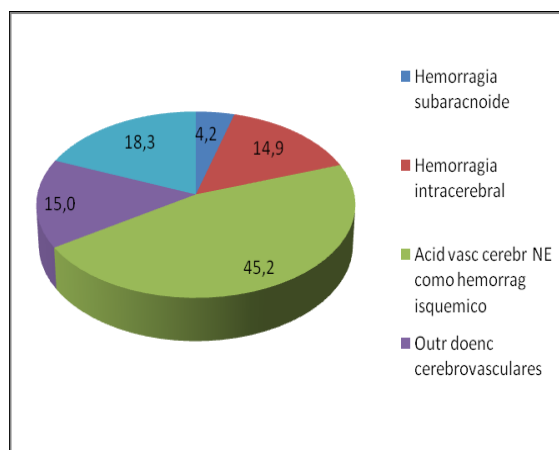
Estes altos números colocam o Brasil entre os dez países com maior índice de mortes por doenças cardiovasculares. Estudos do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (São Paulo) mostraram que 60% das vítimas são homens, com idade média de 56 anos. No Espírito Santo as doenças do aparelho circulatório representam a primeira causa de óbito para ambos os sexos, principalmente a partir dos 50 anos de idade, prevalecendo os óbitos por doença isquêmica do coração e doença cerebrovascular (Gráficos 1 e 2) (PORTAL BRASIL, 2011; WHO, 2012; SESA, 2012).

Gráficos 1 e 2 - Proporção de óbitos por doença isquêmica do coração e doença cerebrovascular na população adulta. Espírito Santo, 2010.

DOENÇA ISQUÊMICA DO CORAÇÃO



DOENÇA CEREbroVASCULAR



Fonte: SIM/SESA (2012).

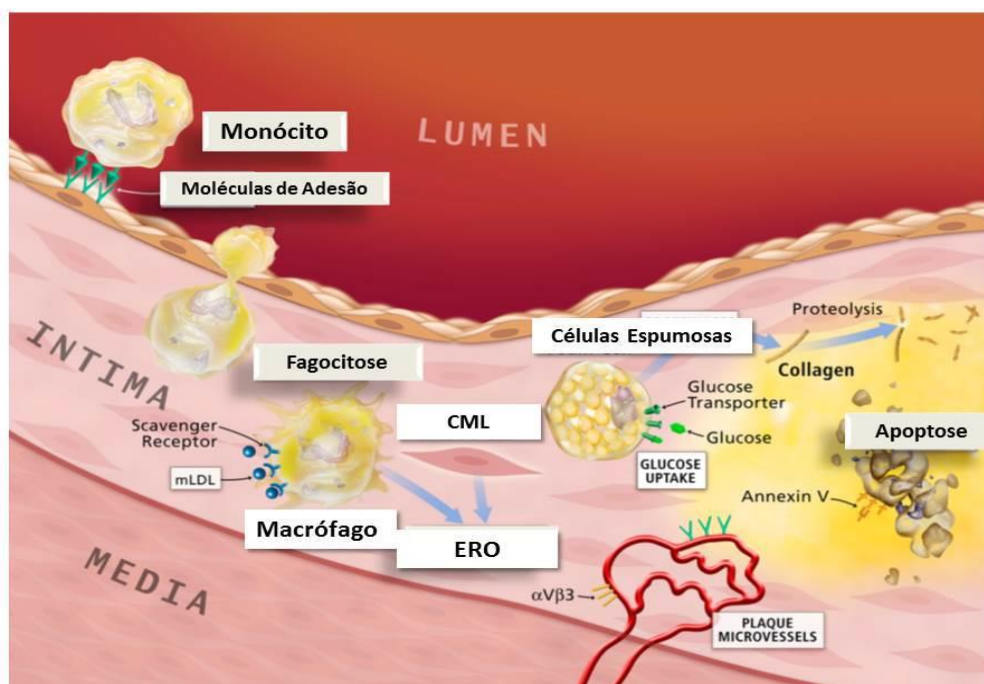
Dentre as DCV's, a doença isquêmica do coração, o AVC e a hipertensão arterial são bastante estudadas devido ao seu alto índice de morbi-mortalidade e por se desenvolverem em decorrência da aterosclerose (WHO, 2014). Ainda que avanços terapêuticos na área cardiovascular sejam frequentes, estima-se que essa forte repercussão sobre o padrão de morbi-mortalidade tende a persistir devido, principalmente, ao aumento da população idosa e da expectativa de vida associados ao sedentarismo e a dietas hiperglicídicas e/ou hiperlipídicas, que contribuem para consolidar esses dados epidemiológicos (BARRETO et al., 2003; V DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE, 2013).

1.2 Aterosclerose

A aterosclerose é uma DCV inflamatória crônica de origem multifatorial caracterizada pela formação de placas de constituição fibrosa e lipídica (ateroma) que diminuem progressivamente o diâmetro dos vasos sanguíneos (BERLINER et al., 1995).

A Aterosclerose desenvolve-se em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre, o que pode levar à isquemia vascular. Cada tecido ou órgão responde à inflamação de forma dependente de suas características celulares próprias e da arquitetura do tecido lesado, bem como do suprimento sanguíneo e da natureza dos agentes agressores. Entretanto, ainda que a resposta à lesão seja característica em cada local afetado, a resposta celular e a biologia vascular da aterosclerose são similares nos diversos tecidos e órgãos, e sugerem inúmeros processos moleculares como, por exemplo, ativação de moléculas de adesão, acúmulo e ativação de células brancas do sangue, peroxidação lipídica, apoptose, alterações em células musculares lisas, linfócitos e monócitos (Figura 1) (ROSS, 1999; LIBBY; DICARLI; WEISSLEDER, 2010).

Figura 1 – Processos biológicos e moléculas presentes na placa aterosclerótica.



Nota: As partículas de LDL oxidadas são fagocitadas pelos macrófagos originando as células espumosas. Concomitantemente à maior expressão de moléculas de adesão celular, a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's) pelos macrófagos e células musculares lisas é aumentada no interior da placa. Fonte: Libby, Dicarli e Weissleder (2010). Adaptado.

Vários fatores de risco podem resultar no processo aterosclerótico, como, por exemplo, hereditariedade, hipertensão arterial, dislipidemia, diabetes, obesidade, idade, tabagismo e sedentarismo (GRUNDY et al., 1999). Esses fatores são capazes de lesar o endotélio vascular causando disfunção endotelial e, assim, a camada íntima fica mais permeável às lipoproteínas que ficam retidas no espaço subendotelial (PAOLETTI; GOTTO JUNIOR; HAJJAR, 2004).

As lipoproteínas são responsáveis pelo transporte e pela distribuição dos lipídeos através do plasma e podem ser classificadas em: lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL), ambas ricas em colesterol, lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), de origem hepática e quilomícrons (QM), de origem intestinal, sendo essas duas últimas classes muito ricas em Triglicerídeos. O

componente proteico das lipoproteínas é chamado apolipoproteína (apo), as quais possuem diversas funções no metabolismo das lipoproteínas, como a formação intracelular de partículas lipoproteicas (apo B100 e apo B48), cofatores enzimáticos (apo CII, CIII e apo AI) e ligantes a receptores de membrana, como é o caso das apo B100 e apoE. (NOVAK; BYDLOWSKI, 1996; JAWIÉN; NASTALEK; KORBUT, 2004).

A dislipidemia (isto é, LDL-colesterol elevado e HDL-colesterol diminuído) é um evento que marca o início da formação da placa aterosclerótica (processo de aterogênese), pois, os altos níveis de colesterol (hipercolesterolemia) aumentam a possibilidade de passagem das LDL para o espaço subendotelial. Dessa forma, após o dano endotelial e o aprisionamento do LDL, este sofre oxidação e torna-se imunogênico causando, assim, a liberação de fatores inflamatórios. Começa então haver aumento da expressão de moléculas glicoproteicas de adesão celular (VCAM-1) e intercelular (ICAM-1), e de proteínas quimioatrativas de monócitos sintetizadas na superfície endotelial, que resulta no recrutamento de monócitos que são atraídos para o local da placa. Logo que os monócitos são recrutados pelas moléculas de adesão, as células T também são estimuladas a entrarem no local da lesão e assim, também participam da formação da lesão aterosclerótica (HANSSON et al., 2002). Uma vez na camada íntima, os monócitos são transformados em macrófagos que possuem receptores especiais chamados “*scavengers*” que fagocitam as moléculas de LDL oxidado. A estrutura formada por macrófagos com LDL oxidado é chamada de célula espumosa e esta é componente das estrias gordurosas, as quais caracterizam a lesão inicial da aterosclerose (LIBBY; RIDKER; MASERI, 2002; PAOLETTI; GOTTO JR; HAJJAR, 2004; V DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATHEROSCLEROSE, 2013).

1.2.1 Aterosclerose Experimental

Diversas espécies animais têm sido utilizadas no estudo da patogênese e do tratamento das lesões da aterosclerose. O camundongo representa o grupo de vertebrados geneticamente modificados mais utilizados em pesquisas

científicas de diversas doenças e, no caso das doenças cardiovasculares, mesmo sendo eles, geralmente, resistentes à aterosclerose, a linhagem C57BL/6 é uma exceção à regra e vem sendo trabalhada em várias frentes de pesquisas cardiovasculares (JAWIÉN; NASTALEK; KORBUT, 2004; CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007).

O camundongo é membro da classe Mammalia, ordem Rodentia, família Muridae, gênero *Mus*, espécie *Mus musculus*. Uma grande vantagem do modelo murino, além de ser relativamente de fácil aquisição e manutenção, é que no camundongo é possível silenciar ou substituir genes de interesse. Na pesquisa sobre a aterosclerose, isso foi realizado concomitantemente por duas equipes de pesquisa, as quais apresentaram o camundongo *knockout* para apolipoproteína E (apoE-KO/apoE^{-/-}) que possui fundo genético C57BL/6J e foi desenvolvido para representar um modelo de estudo da aterosclerose (PIEDRAHITA et al., 1992; PLUMP et al., 1992; NEVES et al., 2013).

A apoE é uma glicoproteína de aproximadamente 34 kD sintetizada primariamente no fígado, mas que também pode ser produzida no cérebro, coração, baço, nos rins, ovários, testículos, pulmões e ainda na pele e em macrófagos (DRISCOL; GETZ, 1984; ELSHOURBAGY et al., 1985; LIN et al., 1986; NAKAI et al., 1996; MAHLEY; RALL JUNIOR, 2000). A apoE é integrante da membrana das lipoproteínas e localiza-se preferencialmente nas VLDL, IDL e HDL, respectivamente, mas pode também ser encontrada no plasma. A apoE está envolvida na redistribuição de triglicerídeos e colesterol em diferentes tecidos; ela funciona como um ligante de alta afinidade para os receptores apoB e apoE (receptores de LDL) e receptor de remanescentes de quilomícrons e tem a função de retirar do plasma as VLDL e IDL via receptor de LDL. Logo, deficiências da apoE causam inúmeras doenças envolvidas com o aumento nos níveis de colesterol e triglicerídeos na circulação, devido ao não-reconhecimento dessas moléculas pelos receptores de membrana dos quilomícrons e pelas moléculas de VLDL, responsáveis por sua captação no fígado (OJOPI; BERTONCINI; DIAS NETO, 2004).

O camundongo apoE^{-/-} é considerado um dos modelos de aterosclerose mais relevantes por apresentar colesterol plasmático com valores superiores a 500mg/dl, a maioria de VLDL, IDL e LDL; assim ele possui níveis

colesterolêmicos cerca de 5-6 vezes maior que os camundongos controles C57BL/6J e desenvolve hipercolesterolemia e lesões arteriais de forma espontânea, sem necessidade de dieta rica em colesterol (PIEDRAHITA et al., 1992; PLUMP et al., 1992; VASQUEZ et al., 2012).

1.3 Espécies Reativas de Oxigênio

Em situações fisiológicas, a utilização de oxigênio (O_2) molecular para a geração de energia via cadeia respiratória mitocondrial produz, ao final do processo, adenosina trifosfato (ATP) e espécies químicas altamente reativas conhecidas como “Espécies Reativas de Oxigênio” (ERO's), as quais atuam como agentes oxidantes no meio celular (TURRENS, 2003; SAMPAIO; MORAES, 2010). São exemplos de EROs: ânion superóxido ($\cdot O_2^-$), radical hidroxila ($OH\cdot$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), além das espécies reativas de nitrogênio (óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ($\cdot ONOO^-$)) as quais também são consideradas como ERO's por muitos pesquisadores e ainda o ácido hipocloroso e o oxigênio singlete (HALLIWELL, 2006; MURPHY et al., 2011).

As ERO's podem ser formadas por causas endógenas, a partir do metabolismo normal da mitocôndria e também por enzimas como, por exemplo, NADPH oxidase, Xantina oxidase, Lipoxigenase, Cicloxigenase, Citocromo P450 (COOPER et al., 2002) e ainda podem ser produzidas durante processos patológicos como, por exemplo, o que ocorre na resposta inflamatória (BERRA; MENCK, 2006).

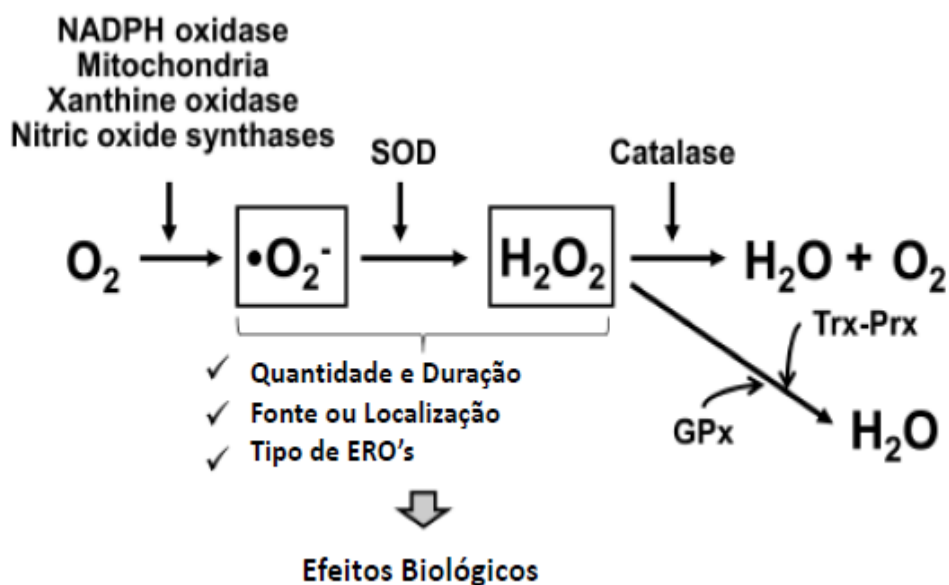
Além das causas endógenas as ERO's podem ser formadas a partir do estímulo de fatores externos como poluentes, agentes químicos, radiações ultravioleta, herbicida, metais pesados (BERRA; MENCK, 2006; XU et al., 2011).

Vários estudos realizados nos últimos anos têm demonstrado que as ERO's participam ativamente em diversos processos biológicos, incluindo o crescimento normal da célula, a diferenciação celular, apoptose e senescência celular (FINKELE, 2003). Segundo Ribeiro e outros (2005), as ERO's podem ser consideradas moléculas com funções de mensageiros secundários, atuando

em vias de regulação de expressão de genes sensíveis aos sinais *redox* e de alterações da homeostase celular, através da síntese de moléculas fisiologicamente ativas.

Normalmente a produção de ERO's é contrabalanceada por vias enzimáticas como, por exemplo: superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e por vias não enzimáticas como as vitaminas A, C e E (RAHMAN, 2007; NAKA et al., 2008). Entretanto, quando o organismo excede a capacidade protetora antioxidante, ocorre o estresse oxidativo (STOCKER; KEANEY, 2004). Com o estresse oxidativo, as ERO's podem interagir com vários componentes celulares como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos e causar danos moleculares e, conforme assinalado na Figura 2, esses efeitos variam de acordo com a quantidade de ERO'S produzida, com a permanência, a fonte e localização do estresse e o tipo de espécie formada (SCANDALIOS, 2005; URAO; USHIO-FUKAI, 2013). A primeira ERO produzida em quase todos os casos relacionados com o estresse oxidativo é o ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) (GALARIS et al., 2008).

Figura 2 – Visão geral das principais fontes endógenas de EROs.



Legenda: SOD: Superóxido Dismutase, GPx: Glutathione peroxidase, Trx-Prx: Thioredoxina-peroxiredoxina. Fonte: URAO e USHIO-FUKAI (2013). Adaptado.

Segundo Madamanchi e outros (2005), há evidências de que células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos são fontes de ERO's que modificam fosfolípidos e oxidam as LDL, além de estarem envolvidas na sinalização vascular durante a formação da lesão aterosclerótica, na disfunção endotelial, na proliferação celular e na apoptose. Além disso, o estresse oxidativo tem sido apontado como um importante fator para a iniciação e progressão de muitas doenças vasculares incluindo hipertensão, aterosclerose e acidentes vasculares (CAI; HARRISON, 2000; BRITO, 2007).

1.4 Importância da Medula óssea

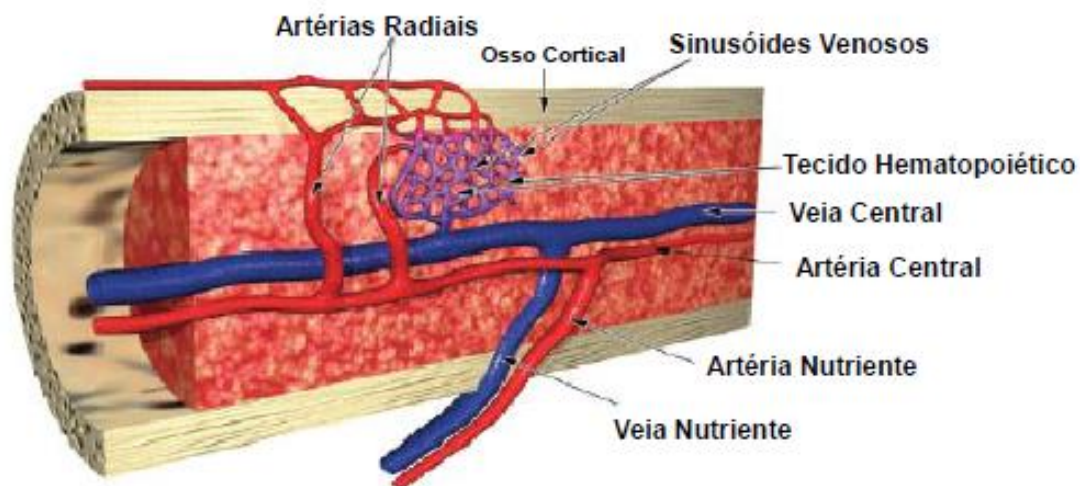
A medula óssea é um órgão difuso, porém volumoso e muito ativo, encontrada no canal medular dos ossos longos e nas cavidades dos ossos esponjosos. A medula óssea pode ser do tipo vermelha, assim denominada devido à numerosa presença de eritrócitos em diversos estágios de maturação e do tipo amarela, rica em células adiposas e que não produz células sanguíneas. Apesar de no recém-nascido toda a medula óssea ser vermelha, no adulto ela é transformada em medula óssea amarela, ficando a medula óssea vermelha restrita ao osso esterno, às vértebras, costelas, díplex dos ossos do crânio e epífises do fêmur e do úmero (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; KRAUSE, 2008).

Desde a vida pré-natal, à medida que a ossificação do esqueleto avança, a medula óssea se torna cada vez mais importante como órgão hematopoiético, ou seja, aquele que atua na produção das células do sangue, processo denominado hematopoese (ou hemocitopoese). Na vida pós-natal, eritrócitos, granulócitos, linfócitos, monócitos e plaquetas se originam a partir de células-tronco da medula óssea vermelha; os linfócitos B se diferenciam na medula, enquanto os linfócitos T provêm de células que migram da medula para o timo e ali se diferenciam (ROSS; ROMRELL, 1993; TRAVLOS, 2006).

A medula óssea vermelha é constituída por células reticulares associadas à colágeno, vasos sanguíneos, capilares sinusóides (unidades especializadas de vasos sanguíneos) e por uma rede esponjosa de células hematopoiéticas

(Figura 3); e a medula ativa contém principalmente células sanguíneas em desenvolvimento e megacariócitos, além de macrófagos, mastócitos, plasmócitos e alguns adipócitos. Diante de toda sua dinâmica e complexidade, a hematopoese depende do microambiente adequado e de fatores de crescimento como, por exemplo, interleucinas e citocinas que regulam a proliferação, diferenciação e a apoptose das células imaturas bem como a atividade funcional das células maduras. Todas as células do corpo são derivadas primariamente da medula óssea e tanto a medula como o timo são chamados órgãos linfoides primários (TRAVLOS, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Figura 3 – Estrutura da medula óssea e microambiente hematopoiético.



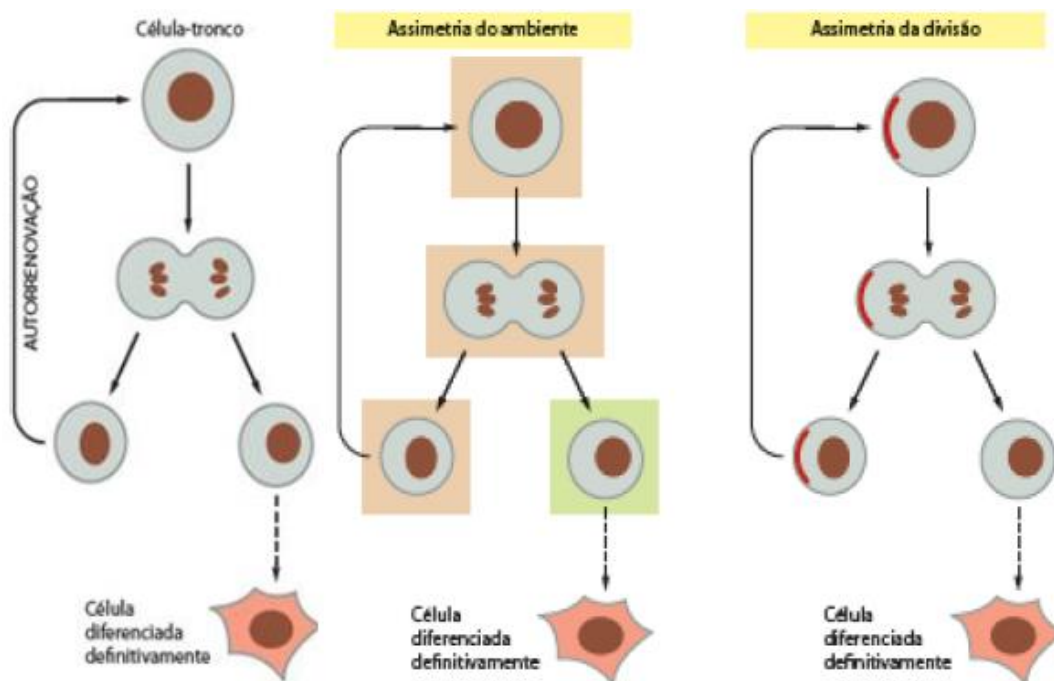
Fonte: Travlos (2006). Modificada.

Dessa forma, no microambiente medular é possível encontrar células-tronco pluripotentes indiferenciadas, células-tronco progenitoras multipotentes, células progenitoras comprometidas com uma única linhagem celular, células precursoras (geralmente constituem os diversos blastos representando a etapa inicial de maturação das células) e também as células sanguíneas em diferentes momentos de maturação. As células-tronco progenitoras podem ser do tipo mesenquimal (estromais) ou hematopoiéticas (CTH). As células progenitoras mesenquimais podem se diferenciar em adipócitos, osteoblastos, condrócitos, mioblastos e em algumas células do tecido conjuntivo. As células hematopoiéticas geram a linhagem linfóide (linfócitos T e B) pelo processo de linfocitopoese e a linhagem mielóide (demais células sanguíneas) pelos

processos de eritrocitopoese, leucocitopoese, plaquetocitopoese. Sendo que monócitos, linfócitos e granulócitos são consideradas as três principais categorias de células brancas do sangue (ALBERTS et al., 2010; DOTSENKO, 2010).

As células-tronco indiferenciadas são capazes de auto-renovação e de se diferenciar, sob certos estímulos, em pelo menos um tipo de célula madura (especializada). Apesar de muitos órgãos adultos como fígado, cérebro, tecido gorduroso, pele e intestino delgado manterem um reservatório de células-tronco indiferenciadas, a medula óssea é considerada a principal fonte de células-tronco adultas. Essas células-tronco adultas realizam uma divisão assimétrica originando uma célula comprometida com a diferenciação e outra que mantém as características primitivas da célula original, repondo o número de células indiferenciadas; geralmente o ambiente medular é determinante no destino da célula produzida na divisão assimétrica (Figura 4). As células-tronco adultas tornam possível a regeneração de danos e a reposição de células senescentes ao longo da vida (KAJI; LEIDEN, 2001; ARAUJO et al., 2009; ALBERTS et al., 2010).

Figura 4 – Vias de divisão celular das células-tronco adultas.



Nota: Representação esquemática das possíveis variáveis de divisão celular assimétrica das células-tronco adultas. Fonte: Alberts e outros (p. 1420, 2010). Adaptado.

Face ao exposto, a medula óssea vem sendo fortemente estudada sob seu aspecto imprescindível à manutenção da vida dos organismos, tanto pela formação das células sanguíneas pelo processo de hematopoiese como pela auto-renovação e manutenção das células-tronco indiferenciadas inclusive nos indivíduos adultos, fornecendo possibilidades de transplantes e tratamentos de diversas doenças. Suas características, sua funcionalidade e capacidade plástica são investigadas em situações fisiológicas e inúmeras fisiopatológicas como, por exemplo, Câncer, Diabetes, Nefropatias, Cardiopatologias, Doenças que atingem o sistema nervoso central etc (KAJI; LEIDEN, 2001; WEIMANN et al., 2003; GUARITA-SOUZA et al., 2005; SAMBUCETI et al., 2009; PORTO et al., 2011; LIMA et al., 2012; YANG et al., 2015; XIAO WANG et al., 2015).

De acordo com LIU, CAO e FINKEL (2011) o fato de as células-tronco adultas serem fonte de inúmeros tipos diferentes de células maduras e também de persistirem por longos períodos de tempo sugere que essas células multipotentes podem demandar de um mecanismo de proteção específico contra os efeitos das ERO'S a longo prazo e do dano oxidativo, sendo que, uma adaptação a esse favor pode ser o metabolismo intrínseco das células-tronco.

Segundo Wessely (2010) desbalanços na regulação da proliferação celular e no equilíbrio com a morte celular programada (isto é, apoptose) desempenham importante papel no contexto das doenças cardiovasculares; e para Soehnlein e Swirski (2013) as vias envolvidas no metabolismo do colesterol controlam a proliferação de células hematopoiéticas e progenitoras.

Já Tonini e outros (2013) relataram que células mononucleares de medula óssea de camundongos hipercolesterolêmicos apresentam aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, danos ao DNA e apoptose.

1.5 Sildenafil

O Citrato de Sildenafil foi sintetizado por um grupo de químicos farmacêuticos investigadores da Pfizer e, inicialmente, estudado na hipertensão e na angina de peito, porém, os estudos clínicos iniciais demonstraram que o fármaco apresentava pouco efeito na angina de peito e induzia ereção do pênis. Logo

que foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1998, o Sildenafil (Viagra® Pfizer, Nova York, EUA) passou a ser utilizado para o tratamento da disfunção erétil (FINK et al., 2002; AVERSA et al., 2007; SCHWARZ et al., 2007; AU et al., 2013)

A excitação sexual estimula vias neurais que resultam na liberação de óxido nítrico (NO) de nervos e de células endoteliais diretamente no pênis. O NO penetra no citoplasma das células do músculo liso e se liga à guanilil ciclase solúvel (GCs), essa interação estimula a GCs a produzir monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) a partir de guanosina trifosfato (GTP). O GMPc, segundo mensageiro responsável por regular diversas respostas fisiológicas, ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG) que, por sua vez, irá atuar na fosforilação de diversas proteínas, resultando em uma diminuição dos níveis intracelulares de cálcio e, conseqüentemente, em relaxamento do músculo liso, dilatação arterial e constrição venosa, rigidez e ereção peniana (ZUSMAN et al., 1999; CORBIN, 2004).

O equilíbrio da via NO/GMPc/relaxamento se dá por meio da degradação do GMPc, a qual é feita por enzimas da família das fosfodiesterases (PDEs), que compreendem uma gama de enzimas as quais inibem a atividade dos segundos mensageiros nas células por hidrolisarem a ligação fosfodiéster do GMPc e, dessa forma, modularem os níveis intracelulares de GMPc (RAJA; NAYAK, 2004; SARAIVA, 2010).

A fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) é a principal responsável pela hidrólise de GMPc em diversos tipos de tecidos ou células e está presente em grande concentração no coração, cérebro, pulmão, rins, músculo liso vascular sistêmico, corpo cavernoso do pênis, nas plaquetas e no músculo liso visceral e pode ser considerada como um dos principais reguladores da resposta muscular à ativação da cascata NO/GMPc (SODERLING; BAYUGA; BEAVO, 1998; ESSAYAN, 1999; GLOSSMANN; PETRISCHOR; BARTSCH, 1999; WALLIS et al., 1999; GIORDANO et al., 2001). Em 2007 Foresta e outros demonstraram, por meio da reação em cadeia da polimerase (rtPCR) e posterior sequenciamento, que o RNAm para PDE5 também é expresso na medula óssea humana.

Nesse cenário, o Sildenafil aumenta a biodisponibilidade do GMPc e estimula a via do óxido nítrico (NO/GMPc) por meio da inibição da PDE5, promovendo efeitos de vasodilatação e relaxamento (TERRETT et al., 1996).

Além da Disfunção Erétil, o uso do Sildenafil vem sendo aplicado de forma importante no tratamento da Hipertensão Arterial Pulmonar, Fenômeno de Raynauds e também em diversas pesquisas sobre doenças cardiovasculares (GUIMARÃES et al., 1999; ZHAO et al., 2001; KUKREJA et al., 2011; DONATO et al., 2013).

O sildenafil também atua como vasodilatador, produzindo um balanço hemodinâmico entre a diminuição da resistência arterial e o aumento da complacência venosa (JACKSON et al., 1999). Segundo Chau e outros (2011) o Sildenafil atenua a progressão da insuficiência cardíaca quando administrado três dias após o infarto do miocárdio.

Nos processos inflamatórios o Sildenafil desempenha função anti-inflamatória por meio da prevenção e/ou diminuição de peroxidação lipídica, da formação de oxidantes e da produção de citocinas e acúmulo de neutrófilos (ISERI et al., 2009; KARAKOYUN et al., 2011).

Diversos estudos apontam o Sildenafil como um fator antioxidante, relacionando-o com a diminuição do estresse oxidativo (DUSSAULT et al., 2009; GOKAKIN et al., 2013).

Em um experimento com camundongo hipercolesterolêmico (modelo apoE^{-/-}) tratados com Sildenafil na dose de 40 mg/kg corporal/dia na água de beber, Dussault e outros (2009) anunciaram o aumento significativo do número de células progenitoras endoteliais (EPCs) e também uma modulação positiva das atividades funcionais dessas células como, por exemplo, o aumento da capacidade de migração. Nesse mesmo trabalho o autor também demonstrou que o Sildenafil foi capaz de melhorar a neovascularização induzida por isquemia.

Recentemente, Balarini e outros (2013) demonstraram que o tratamento crônico com Sildenafil no modelo experimental de aterosclerose, o camundongo apoE^{-/-} apresentou benefícios com relação à biodisponibilidade de óxido nítrico e à função endotelial, proporcionando redução da deposição de placa aterosclerótica por meio da diminuição do estresse oxidativo.

Além disso, o tratamento por três semanas com Sildenafil no modelo murino de aterosclerose (apoE^{-/-}) também foi eficaz na redução de marcadores genotóxicos, evidenciado pela menor fragmentação de DNA em células mononucleares do sangue e células do fígado dos animais tratados com Sildenafil (RODRIGUES et al., 2013).

O tratamento crônico com Sildenafil em modelo apoE^{-/-} também teve efeito protetor contra a vasoconstrição via mecanismos de sinalização da cascata NO/GMPc, o que foi acompanhado pela redução do estresse oxidativo e da deposição lipídica (LEAL et al., 2015).

Sendo assim, o Sildenafil tem se mostrado uma escolha terapêutica promissora no tratamento de doenças cardiovasculares acompanhadas do aumento de colesterol circulante.

Hipótese

2 HIPÓTESE e JUSTIFICATIVA

Dada a importância das células-tronco na renovação e manutenção das populações de células de todo o corpo, inclusive daquelas que participam do processo inflamatório envolvido na aterosclerose e, levando em consideração os avanços e as descobertas sobre a atuação do Sildenafil nas doenças cardiovasculares e observando que a fosfodiesterase 5 também é expressa em células de medula óssea, a hipótese desse trabalho foi de que o Sildenafil poderia amenizar ou até mesmo prevenir alguns dos efeitos da hipercolesterolemia/aterosclerose refletidos nas células de medula óssea de camundongos apoE *knockout*.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento crônico com sildenafil sobre as células de medula óssea de camundongos apoE^{-/-} machos.

3.2 Objetivos Específicos

Nas células de medula óssea de camundongos apoE^{-/-} machos de 3 meses e seus respectivos controles:

- a. Avaliar a Viabilidade Celular
- b. Verificar os níveis citoplasmáticos de espécies reativas de oxigênio
- c. Avaliar as fases do ciclo celular e possível fragmentação do DNA
- d. Verificar se há dano no material genético

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais Experimentais

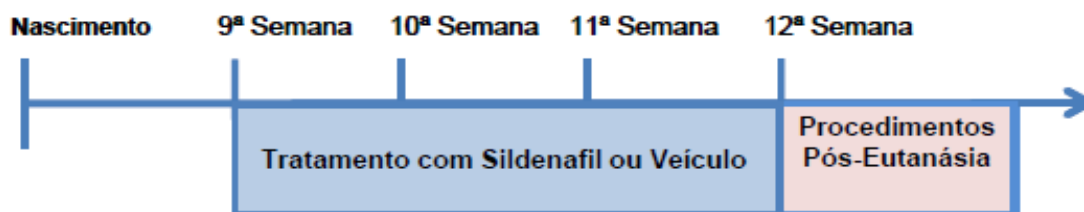
Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos, com 03 meses de idade, provenientes do biotério do Laboratório de Fisiologia Translacional (LFT), pertencente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram mantidos em gaiolas com até 5 animais em cada gaiola, onde receberam água e ração *ad libitum* e tiveram ciclo de 12 horas claro/escuro controlado, bem como temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (70%) do ambiente. A utilização dos animais foi realizada de acordo com normas estabelecidas pelo conselho nacional de controle de experimentação animal – CONCEA e pela Lei brasileira que regulamenta procedimentos para o uso científico de animais (Lei Arouca) Nº 11.794 e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa com Animais da UFES/CEUA-UFES (Protocolo 008/15).

Os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos: controle (C57BL/6; n=8), veículo (ApoE^{-/-} V; n=8) e tratado (ApoE^{-/-} S; n=8).

Para o grupo que recebeu tratamento com Sildenafil (Viagra® - Pfizer, SP, Brasil) foi feita gavagem do medicamento, na dose de 40 mg/Kg/dia, durante 3 semanas, a partir da 9ª semana de vida. Essa dose foi escolhida com base em estudos prévios em animais e humanos, levando em consideração que a biodisponibilidade do Sildenafil é reduzida e sua eliminação é mais rápida em camundongos, comparado ao homem (WALKER et al., 1999).

Ao grupo controle (C57) e ao grupo veículo (apoE^{-/-} V) foi feita gavagem com água destilada pelo mesmo período de 3 semanas, iniciando-se na 9ª semana de vida.

A linha do tempo abaixo esquematiza o período em que foram realizadas as gavagens e coletas de sangue caudal nos três grupos:



4.2 Coleta e Isolamento das células de medula óssea

Para o isolamento das células de medula óssea os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de tiopental sódico (0,15M) e submetidos à toracotomia para exposição do coração e demais órgãos. Primeiramente foi coletado cerca de 1mL de sangue do ventrículo direito (VD) para a dosagem de colesterol plasmático. Posteriormente foi feita incisão na região acima do acetábulo do membro inferior, permitindo a remoção de fêmures e tíbias que imediatamente foram postos em meio de cultura DMEN (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; GIBCO) onde foi feita a retirada do músculo e limpeza dos ossos. Foi feito um corte rente às extremidades epifisárias do fêmur e da tibia a fim de expor o canal medular e, assim, foi possível realizar o *flush* utilizando-se uma agulha de 26 gauge e seringa com meio de cultura DMEM (GIBCO). Por meio do *flush* obteve-se uma suspensão de medula óssea a qual foi homogeneizada e centrifugada a 1200 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos (*Eppendorf: Centrifuge 5702*). O sobrenadante foi desprezado, as células ressuspendidas em 2 mL de solução de lise de hemácias 1x (BD Pharm Lyse, Lysing Buffer, # 555899) e as amostras foram misturadas e deixadas 5 minutos a 37°C; após esse tempo, à reação foram adicionados 4 mL PBS 1x e centrifugado por 5 minutos a 1200 rpm. Após essa centrifugação, o sobrenadante foi aspirado cuidadosamente com a pipeta e descartado. Ao *pellet* foi adicionado 2 mL de PBS 1x, homogeneizado e novamente centrifugado a 1200 rpm por 5 minutos. Esse último procedimento foi repetido e uma alíquota foi separada para a contagem de células na câmara de Neubauer. As amostras de células de medula óssea eram mantidas na geladeira (aproximadamente 4°C) por, no máximo, duas horas até o momento da realização dos ensaios de citometria.

4.3 Quantificação e Estimativa de Viabilidade Celular

Para estimar o número obtido de células no isolamento da medula óssea, foi estabelecida uma diluição de 40 vezes da amostra de células, de modo que foram pipetados 10 µl da suspensão de células isoladas e adicionados à 90 µl de PBS 1x (GIBCO). Em seguida, uma alíquota de 10 µl desta solução foi pipetada e adicionada em outro microtubo contendo 10 µl de solução de Turck (ácido acético 2% com azul de metileno). A solução de Turck realiza a lise das hemácias e plaquetas contidas na amostra. Uma alíquota de 10 µl da solução Células/Turck foi novamente pipetada e adicionada em 10 µl solução de azul de Trypan 0,4%. A solução (células/Turck/Trypan) foi homogeneizada, colocada na câmara de Neubauer e quantificada com auxílio do microscópio óptico no aumento de 40X. As células foram contadas nos quatro quadrantes externos da câmara seguindo sempre a mesma direção para que a mesma célula não fosse contada duas vezes. O número de células da amostra foi obtido pela equação: **$Q = 40 \times 10^4 \times 1 \text{ mL} \times (\text{N}^\circ \text{ células} / 4)$** .

Na qual:

Q significa a Quantidade de células

40 corresponde ao fator de diluição

10^4 indica o fator de correção da Câmara de Neubauer

1 mL é o volume amostra.

Nº células é o número total de células contadas na Câmara

O objetivo deste cálculo é verificar se as amostras de células de medula óssea apresentavam pelo menos 10^6 células na suspensão, para que pudessem ser utilizadas nos ensaios de citometria de fluxo. Os valores obtidos para as células de medula óssea ficavam na faixa de 10^7 células/mL.

A estimativa da viabilidade das células de medula óssea foi realizada simultaneamente pelo o método de exclusão do corante azul de Trypan durante

a contagem em câmara de Neubauer. O corante azul de Trypan auxilia na estimativa de viabilidade celular da amostra a ser trabalhada, pois, por este método, as células mortas coram em azul, uma vez que sua membrana é permeável ao corante, já a membrana das células vivas não é permeável e, portanto, estas não coram. Desta forma, ao visualizar as células ao microscópio observou-se que as células mortas apresentaram-se com uma coloração azul escuro e as células vivas ficaram translúcidas. Para calcular a viabilidade celular, a média de células vivas foi dividida pela média total de células (vivas e mortas) contadas na câmara de Neubauer e o valor obtido multiplicado por 100, fornecendo um valor em porcentagem. As amostras eram consideradas viáveis quando o valor em porcentagem da viabilidade obtida na contagem era superior a 90% e assim seguiam para os protocolos de citometria.

4.4 Ensaios realizados por citometria de fluxo

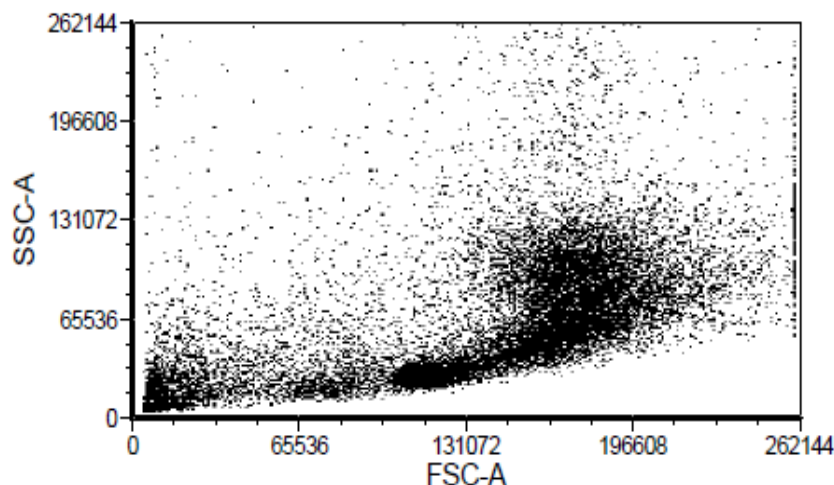
A fim de determinar as espécies reativas de oxigênio e analisar o Ciclo Celular das células de Medula óssea, foi utilizado o citômetro de fluxo FACSCanto II (*Becton Dickson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA*) acoplado a um computador onde era possível visualizar os histogramas e *dot plots* diversos gerados na aquisição das amostras.

A análise das células por meio do citômetro de fluxo é feita com base em informações sobre as características celulares, como tamanho e complexidade/granulosidade, as quais são fornecidas em forma de gráficos de *Dot plots* (gráfico de pontos) e histograma. Além disso, é possível determinar a intensidade de fluorescência emitida de acordo com cada sonda utilizada nos diferentes ensaios como, por exemplo, DHE, DCF-DA, PI as quais emitem um determinado comprimento de onda que é lido e interpretado pelos filtros do citômetro de fluxo.

Em todas as amostras adquiridas no citômetro, sempre era gerado um gráfico *dot plot* característico do tipo celular que representa as populações celulares

presentes na amostra e suas posições relativas no gráfico (Figura 5) de acordo com o tamanho (FSC) e a complexidade celular (SSC).

Figura 5 – *Dot plot* típico de células totais de medula óssea.



Para todos os ensaios de citometria de fluxo foram adquiridos 20.000 eventos em cada amostra e os dados coletados foram analisados por meio dos softwares BD FACS Diva e *FCS Express 4* (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA).

4.4.1 Determinação dos Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Os níveis de EROs foram medidos por citometria de fluxo através da fluorescência emitida por sondas específicas para cada ensaio.

Para a detecção do ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) foi realizado o ensaio do dihidroetídeo (DHE) da seguinte forma: as amostras foram lavadas e ressuspensas em 1 mL de PBS na concentração de 1×10^6 células/mL. Posteriormente foram incubados com solução de DHE 1,25 mM por 30 minutos a 37°C e no escuro. Para o controle positivo foi utilizado 2 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por 5 minutos; já o controle negativo foi constituído de amostra apenas com a suspensão celular.

A reação que ocorre nesse período de incubação é a seguinte: o DHE entra livremente na célula, reage com o ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) e forma o etídeo; este se liga ao DNA causando a amplificação da fluorescência vermelha (518-605nm). No Citômetro os sinais foram obtidos utilizando filtro de 585nm para DHE.

Desta forma a oxidação do DHE é proporcional à quantidade de ($\cdot\text{O}_2^-$) presente na célula e perceptível por meio da intensidade de fluorescência.

Para a determinação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi realizado o ensaio de diclorofluoresceína (DCF) da seguinte forma: as amostras foram lavadas e ressuspensas em 1 mL de PBS na concentração de 1×10^6 células/ml. Posteriormente foram incubadas com solução de 20mM diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA) por 30 minutos a 37°C e no escuro. Para o controle positivo foi utilizado 2 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por 5 minutos; já o controle negativo foi constituído de amostra apenas com a suspensão celular.

O H_2DCFDA é um éster não-fluorescente, internalizado pelas células e que se incorpora às regiões hidrofóbicas. Dentro da célula o H_2DCFDA perde o grupo diacetato pela ação de esterases intracelulares, resultando na formação de diclorodihidrofluoresceína (DCFH), que pode ser oxidado pelo (H_2O_2) e formar diclorofluoresceína (DCF), composto altamente fluorescente. Assim, a oxidação do DCFH-DA é proporcional à quantidade de (H_2O_2) presente na célula e perceptível por meio da intensidade de fluorescência emitida. Os sinais foram obtidos utilizando filtros de 530 nm para DCF.

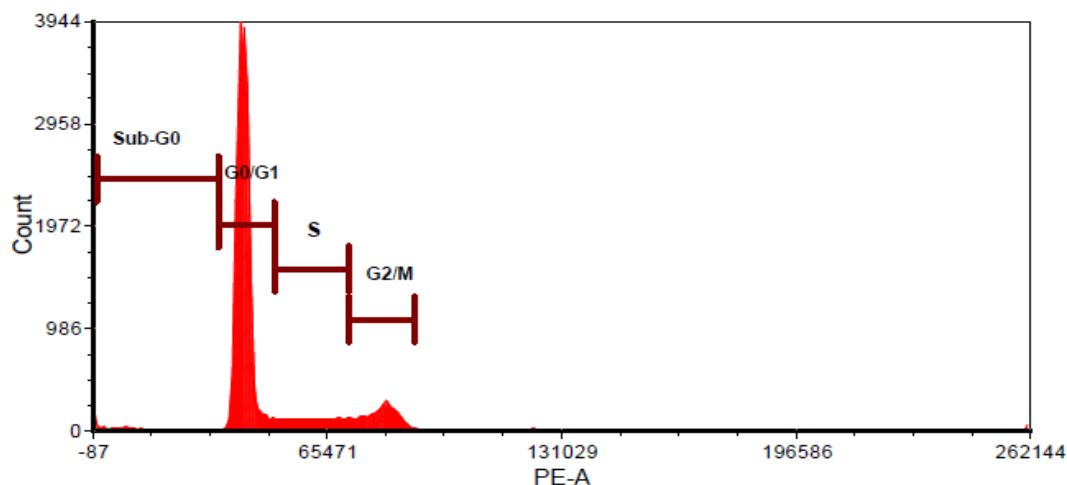
4.4.2 Análise do Ciclo Celular das células de medula óssea

O ciclo celular foi analisado por meio do ensaio com Iodeto de Propídeo (PI) que é um agente intercalante do DNA e, por essa característica, a quantidade de DNA intercalado é diretamente proporcional à fluorescência emitida pela sonda, que é detectada no citômetro de fluxo pelo filtro de 585nm.

Para que o PI pudesse entrar na célula e se intercalar ao DNA, ele foi preparado em solução de trabalho contendo RNase, Triton X-100 e Tris-Cl 3,4 mM (pH 7,6), a qual foi adicionada em 1 mL de amostra em PBS 1X e incubado por 10 minutos a -20°C.

Na aquisição dos dados pela citometria de fluxo aproximadamente 200 células por segundo foram adquiridas para que fosse possível determinar em qual fase do ciclo celular cada célula se encontrava. As fases do ciclo celular foram visíveis em histograma de análise de DNA disponível no software FACS Diva, com coordenadas PI *versus* quantidade de células (PI vs Count.); pelo histograma (Figura 6) é possível identificar a proporção de células com DNA fragmentado (região Sub-G0), com DNA característico de célula diploide (região G0/G1), com DNA em duplicação (região S) e com DNA já duplicado (região G2/M). A porcentagem de células em cada fase do ciclo foi calculada pelo software *FCS Express 4*.

Figura 6 – Histograma típico representativo do ciclo celular obtido após marcação com PI.



4.5 Determinação dos Níveis de Colesterol Plasmático e Triglicerídeos

A análise de lipídeos plasmáticos bem como a de Triglicerídeos foi feita com o sangue coletado do ventrículo direito imediatamente antes da eutanásia, sendo o animal previamente anestesiado com Tiopental sódico (40mg/kg) ip. O sangue em *ependorf* heparinizado foi centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm

para a separação do plasma. O colesterol e os triglicerídeos plasmáticos foram medidos com o uso de kits enzimáticos comerciais (Bioclin, Brasil) e a aquisição dos dados foi feita pela leitura das amostras em espectrofotômetro a 500 nm.

4.6 Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo é um protocolo padronizado por Von Ledebur e Schmid em 1973 e vem sendo amplamente utilizado como método de estimativa de danos mutagênicos e citogenéticos.

O micronúcleo (MN) é um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula, formado por cromossomos ou fragmentos de cromossomo que não são incluídos no núcleo principal durante a mitose (Von Ledebur; Schmid, 1973). Geralmente os micronúcleos possuem dimensões de cerca de 1/3 a 1/5 do tamanho do núcleo principal, possuem membrana nuclear e material cromatínico distribuído de forma similar ao do núcleo; são formados durante o período de divisão celular em consequência de quebras cromossômicas ou de cromossomos inteiros que, por não se ligarem às fibras do fuso, não são incluídos nos núcleos das células filhas (Schmid, 1975).

O ensaio do micronúcleo detecta alterações cromossômicas/genômicas e de dano ao aparato mitótico, sendo os micronúcleos indicativos de perdas irreversíveis de DNA (VALADARES; CASTRO; CUNHA, 2007).

Os eventos que levam à formação de MN podem ser induzidos pelo estresse oxidativo, exposição a agentes clastogênicos ou aneugênicos, defeitos genéticos nos checkpoints do ciclo celular e/ou nos genes de reparo do DNA e também pela deficiência de nutrientes requeridos como co-fatores no metabolismo do DNA e na maquinaria da segregação cromossômica (BONASSI et al., 2007).

O teste de micronúcleo em medula óssea de roedores vem sendo amplamente utilizado como teste citogenético *vivo* para estimar o potencial clastogênico (que provoca quebra cromossômica) e aneugênico (que induz aneuploidia ou

segregação cromossômica anormal) de novos fármacos (HAYASHI; SOFUNI; ISHIDATE JR, 1984).

Na medula, os eritrócitos policromáticos (EPC) são células que ainda estão em estágio imaturo de desenvolvimento e quando sofrem maturação se transformam em eritrócitos normocromáticos (ENC) os quais são lançados na corrente sanguínea. Em um organismo considerado sadio, a proporção de EPC:ENC é de 1:1, significando que a produção desse tipo celular está em equilíbrio. Em situações de dano celular/citotóxico, a proporção de EPC diminui, refletindo numa diminuição na relação EPC/ENC ou EPC/(EPC+ENC). Por ainda apresentarem resquícios de material genético em seu interior, os EPC costumam corar em um tom azulado/roxo com corantes básicos como Leishman/Giensa. Na medula é possível verificar a diferença entre o EPC (em roxo) e o ENC (mais rosado).

A fim de realizar o teste do micronúcleo, durante o período de tratamento/veículo foram feitas coletas de sangue da veia caudal em dois momentos diferentes, sendo um acesso no primeiro dia de tratamento/veículo e outro no último dia de tratamento, imediatamente antes da eutanásia, sob anestesia com Tiopental sódico intraperitoneal (ip) 40mg/kg.

Para o teste do micronúcleo de medula óssea, os ossos dos membros anteriores (úmeros) tiveram suas extremidades epifisárias cortadas e uma agulha foi inserida na cavidade medular e feito flush utilizando-se Soro Fetal Bovino (SFB), a fim de retirar a medula óssea. Em seguida a medula foi centrifugada por 10 minutos a 1000 rpm, descartado o sobrenadante, ressuspendida com 0,5 mL de SFB e centrifugado novamente. Após essa centrifugação a medula foi distribuída nas lâminas histológicas as quais foram fixadas com metanol 24 horas depois do procedimento. O corante utilizado foi o Leishman (Eosina azul de metileno). As lâminas foram analisadas em microscópio de Luz *Olympus CX40* com aumento de 100x (por imersão).

Na avaliação da citotoxicidade foi considerada a razão EPC/(EPC+ENC) sendo que, durante a contagem das duzentas primeiras células observadas na lâmina, foi anotado quantas dessas células eram ENC e quantas eram EPC.

Para avaliar a genotoxicidade/mutagenicidade nos grupos de estudo, foram contados 2000 EPC por animal, sendo 1000 EPC por lâmina e registrado quantos destes EPC apresentaram micronúcleo em seu interior.

No sangue o tipo celular que há em abundância são os ENC, pois, os EPC da medula óssea duram apenas algumas horas após a divisão celular e, geralmente, não chegam ao sangue. Desta forma, a análise de micronúcleo no sangue é feita pela contagem de ENC e de micronúcleos.

A fim de realizar o teste do micronúcleo no sangue realizou-se coleta de uma gota de sangue da veia caudal no primeiro dia e ao final do período de tratamento/veículo. Por meio da técnica do esfregaço, o sangue foi espalhado em lâmina de histologia, fixado em metanol 24 horas após o esfregaço e corado com o corante Leishman no momento da análise. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de luz *Olympus CX40* com aumento de 100x (por imersão).

Foram contados 2000 ENC por animal, sendo 1000 ENC por lâmina e registrado quantos destes ENC apresentaram micronúcleo em seu interior.

4.7 Análise Estatística

Para análise estatística dos ensaios de citometria de fluxo os dados da Mediana de Intensidade de Fluorescência (MIF) obtidos no *software FCS Express 4* foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do *post hoc* de *Fisher*.

Na análise do perfil lipídico foi realizada ANOVA de uma via seguida do *post hoc* de *Tukey*.

As análises estatísticas relacionadas ao teste do micronúcleo foram feitas por meio da ANOVA de uma via, seguida do *post-hoc* de *Tukey* a fim de verificar as diferenças entre os grupos. Quando o objetivo era comparar o mesmo grupo em dois momentos de tratamento (T0 e TF) realizou-se o teste *t* de *Student* para amostras independentes.

Em todos os casos, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o p-valor foi inferior a 5%, ou seja, $*p < 0,05$. Os dados estão expressos como a média dos valores mais ou menos o erro padrão da média (média \pm EPM).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Colesterol Plasmático e Triglicerídeos

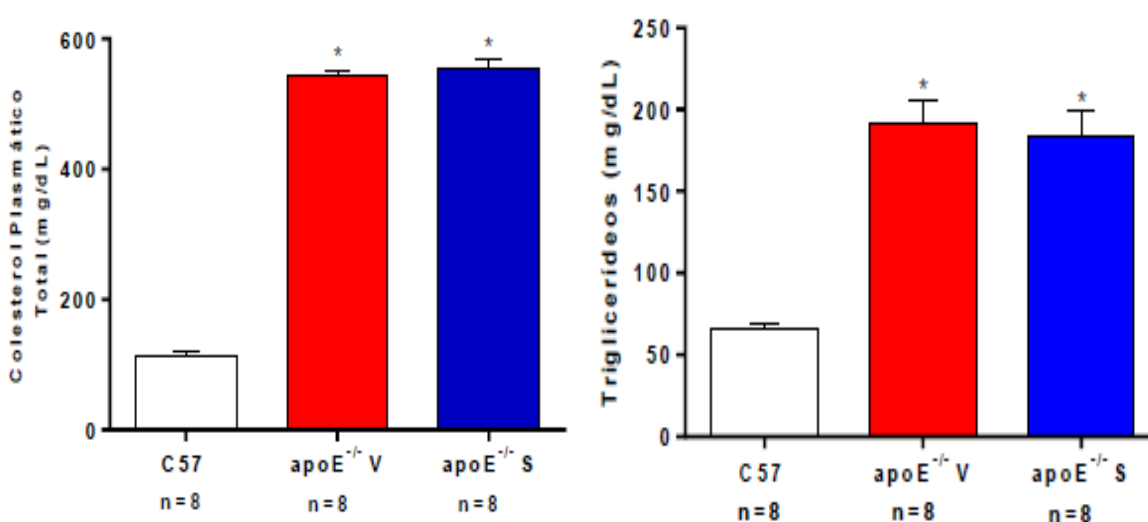
A análise dos níveis de colesterol plasmático e Triglicerídeos fornece informações acerca do modelo de aterosclerose utilizado nesse estudo, e conforme a literatura, é esperado que os camundongos dos grupos apoE^{-/-} apresentem níveis colesterolêmicos mais elevados do que os animais do grupo controle (C57 BL/6J). Os valores obtidos por meio da dosagem de colesterol plasmático e de triglicerídeos estão sumarizados na Tabela 1 e dispostos nos Gráficos 3 e 4 abaixo:

Tabela 1 – Dados do Colesterol Total e Triglicerídeos plasmáticos indicados pela média \pm EPM.

GRUPOS	n	Colesterol Total (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)
C57 (Controle)	8	112,5 \pm 7,0	65,6 \pm 4,0
apoE ^{-/-} Veículo	8	542,0 \pm 10,0*	192,0 \pm 13,5*
apoE ^{-/-} Sildenafil	8	553,9 \pm 14,7*	183,7 \pm 15,7*

Nota: *p<0,05 versus grupo controle. (ANOVA uma via, *post hoc* Tukey).

Gráficos 3 e 4 – Níveis de Colesterol Total e Triglicerídeos plasmáticos.



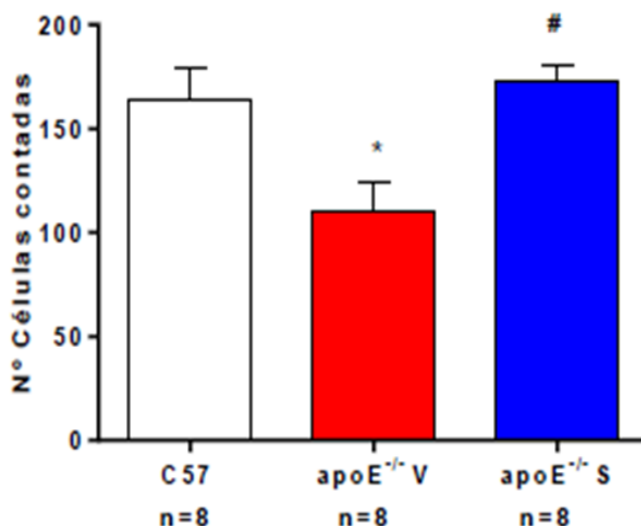
Dados expressos como média \pm EPM. *p<0,05 versus grupo controle. (ANOVA uma via, *post hoc* Tukey).

5.2 Quantificação e Viabilidade Celular

O método de contagem celular pela câmara de Neubauer oferece uma boa estimativa sobre a quantidade e viabilidade das células em suspensão na amostra a ser utilizada nos ensaios de citometria de fluxo. A análise da viabilidade celular foi feita pelo método de exclusão do corante azul de Trypan. Todas as células foram contadas e foi registrado o número de células mortas observado na amostra, desta forma, foi possível calcular o percentual de células vivas e a viabilidade da amostra. Todas as amostras de células isoladas da medula óssea nos três grupos de estudo (C57, apoE^{-/-} V e apoE^{-/-} S) apresentaram viabilidade superior a 95%.

Conforme os dados demonstrados no Gráfico 5 a contagem de células vivas indicou uma diferença significativa na quantidade de células observadas entre os grupos, sendo que o grupo apoE^{-/-} veículo apresentou menor quantidade de células contadas: C57 156,8±5,0 *versus* apoE^{-/-} V 110,8±4,7* *versus* apoE^{-/-} S 173,0±3,0[#] (ANOVA uma via, *post hoc* Tukey).

Gráfico 5 – Número de células contadas na Câmara de Neubauer.



Dados expressos como média ± EPM. *p<0,05 *versus* grupo controle. [#]p<0,05 *versus* grupo veículo. (ANOVA uma via, *post hoc* Tukey).

5.3 Dados obtidos por citometria de fluxo

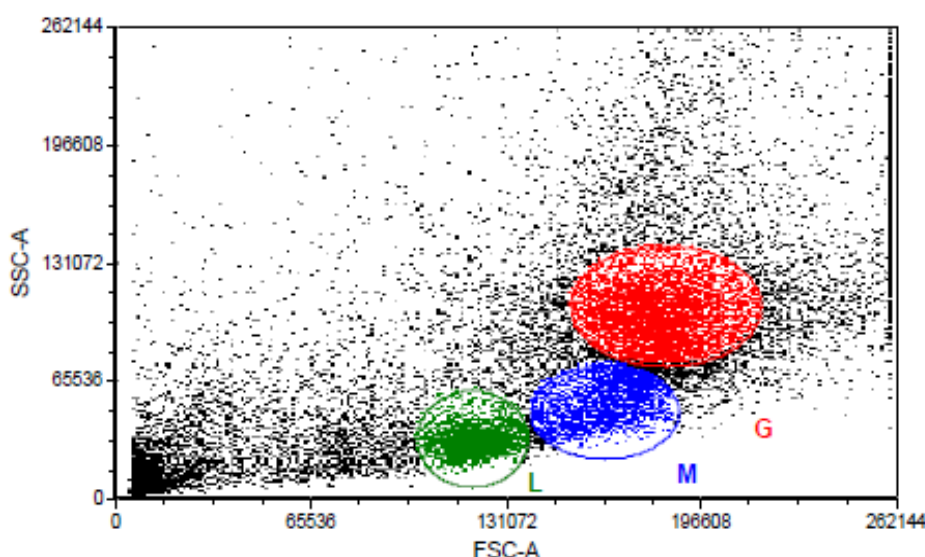
5.3.1 Perfil das populações de células de medula óssea

Todas as amostras de células de medula óssea com viabilidade superior a 95% foram utilizadas nos ensaios de citometria de fluxo, no máximo duas horas após o isolamento.

Em cada ensaio foi gerado um gráfico *dot plot* típico contendo informações acerca das características celulares das populações presentes na amostra. Cada população apresenta tamanho e complexidade característicos do seu tipo celular e, por isso, é possível identificar os diferentes tipos celulares presentes na amostra de células de medula óssea obtida após isolamento e lise de hemácias.

O Gráfico 6 indica as populações das séries linfocítica (L), monocítica (M) e granulocítica (G) observadas nas amostras de células de medula óssea dispostas de acordo com seus tamanhos relativos (*FSC*) e suas complexidades (*SSC*).

Gráfico 6 - *Dot plot* representando as populações de células de medula óssea.



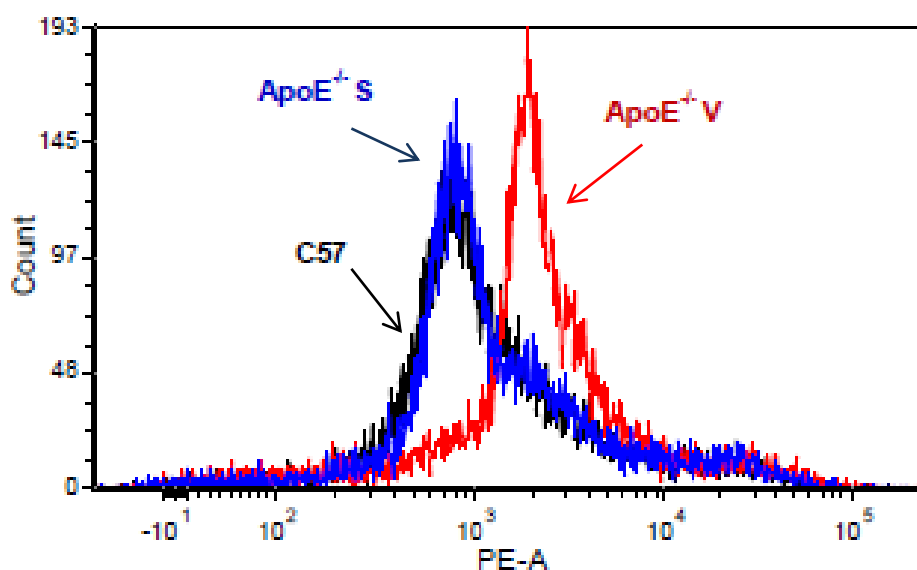
Nota: *FSC* (*forwards cattered light*) corresponde à luz desviada frontalmente ao passar através da célula e *SSC* (*side scattered light*) à luz desviada lateralmente. Marcações representam L: linfócitos, M: monócitos, G: granulócitos.

5.3.2 Níveis de ERO's

Os níveis de EROs das amostras de células de medula óssea foram obtidos por citometria de fluxo pela marcação com DHE e com DCF-DA para avaliar a presença de ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), respectivamente.

A quantidade de ânion superóxido nas células é proporcional à fluorescência emitida pelo dihidroetídeo (DHE) e quanto mais fluorescência emitida mais o histograma gerado na aquisição dos dados é deslocado para a direita (Figura 7).

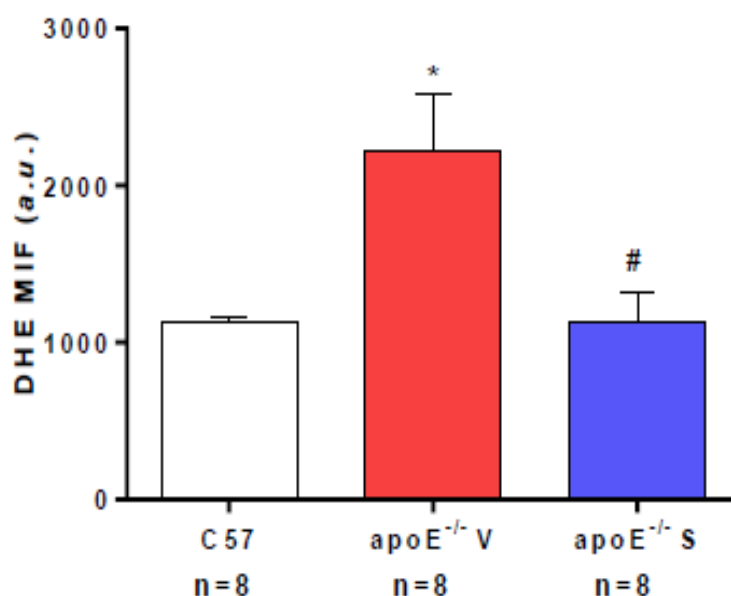
Figura 7 - Histograma típico de intensidade de fluorescência emitida por DHE (eixo X, interpretado pelo filtro PE-A) pela quantidade de células marcadas (eixo Y, Count).



Nota: Histogramas dos grupos representados por cores diferentes, sendo controle (em preto), tratado (em azul) e veículo (em vermelho). Escala logarítmica.

Como demonstrado no Gráfico 7, onde os valores indicam a Mediana de Intensidade de Fluorescência (MIF) emitida pelo DHE, é possível perceber os níveis elevados de $\cdot\text{O}_2^-$ no grupo veículo em comparação aos grupos controle e tratado (apoE^{-/-} V: 2217,6±361,0* versus C57: 1128,2±28,0 versus apoE^{-/-} S: 1125,7±190,8[#]).

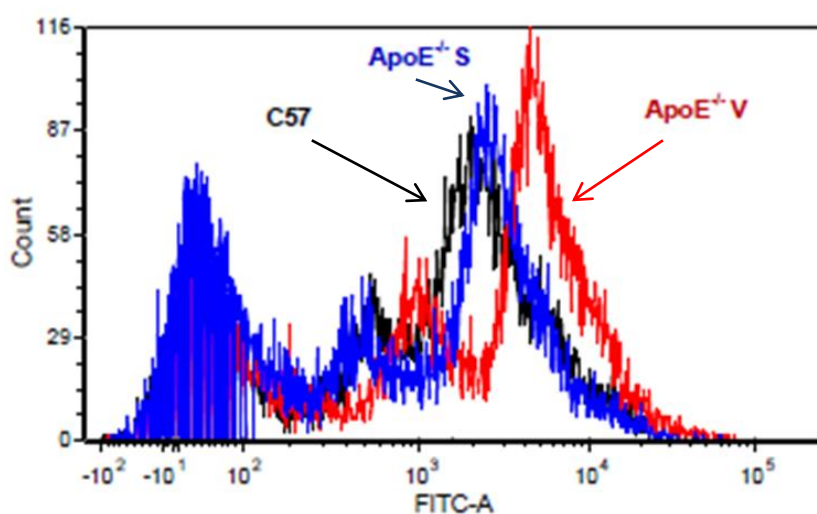
Gráfico 7 – Níveis de $\cdot\text{O}_2^-$ em células de medula óssea.



Valores indicam $\text{MIF} \pm \text{EPM}$. * $p < 0,05$ versus grupo controle. # $p < 0,05$ versus grupo veículo. (ANOVA uma via, *post hoc* Fisher).

Na aquisição dos níveis de H_2O_2 nas células de medula óssea por citometria de fluxo, a quantidade de H_2O_2 é proporcional à fluorescência emitida pelo DCF e quanto mais fluorescência emitida por DCF mais o histograma gerado na aquisição dos dados é deslocado para a direita (Figura 8).

Figura 8– Histograma típico de intensidade de fluorescência emitida por DCF.

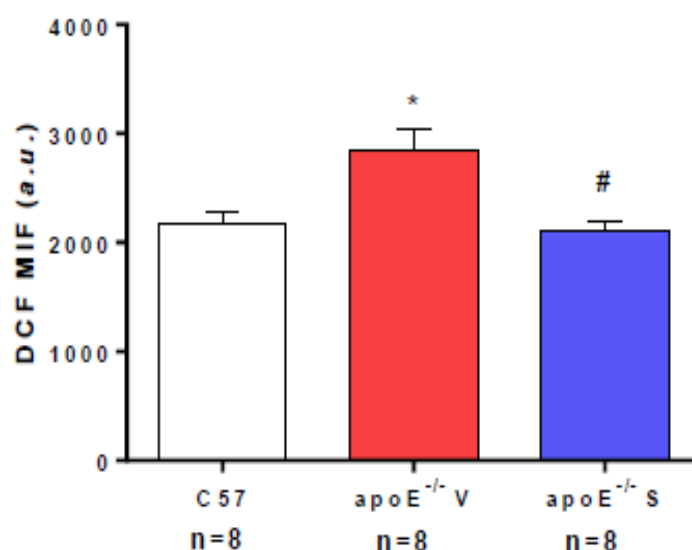


Nota: Histogramas dos grupos representados por cores diferentes, sendo controle (em preto), tratado (em azul) e veículo (em vermelho). (eixo X,

interpretado pelo filtro FITC-A) pela quantidade de células marcadas (eixo Y, *Count*). Escala logarítmica.

Os níveis de H_2O_2 detectados na citometria pela fluorescência do DCF também se apresentaram aumentados no grupo $apoE^{-/-}$ V, com valores de $2847,0 \pm 191,0^*$ versus C57: $2181,0 \pm 107,7$ versus $apoE^{-/-}$ S: $2107,0 \pm 80,60^\#$ (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Níveis de H_2O_2 em células de medula óssea.



Valores indicam $MIF \pm EPM$. * $p < 0,05$ versus grupo controle. # $p < 0,05$ versus grupo veículo. (ANOVA uma via, *post hoc* Fisher).

Ambos os resultados evidenciam o acúmulo intracelular de ROS em animais hipercolesterolêmicos ($apoE^{-/-}$) em relação aos animais saudáveis (C57) e tratados.

Ao comparar as barras do grupo controle (C57) com o grupo tratado ($apoE^{-/-}$ S) nota-se que não há diferença estatisticamente significativa entre ambos, esse fato permite inferir a ocorrência de uma possível proteção antioxidante nos animais doentes tratados com Sildenafil ($apoE^{-/-}$ S) em relação aos não tratados ($apoE^{-/-}$ V) ao ponto de equipará-los ao grupo controle.

5.3.3 Análise das fases do ciclo celular

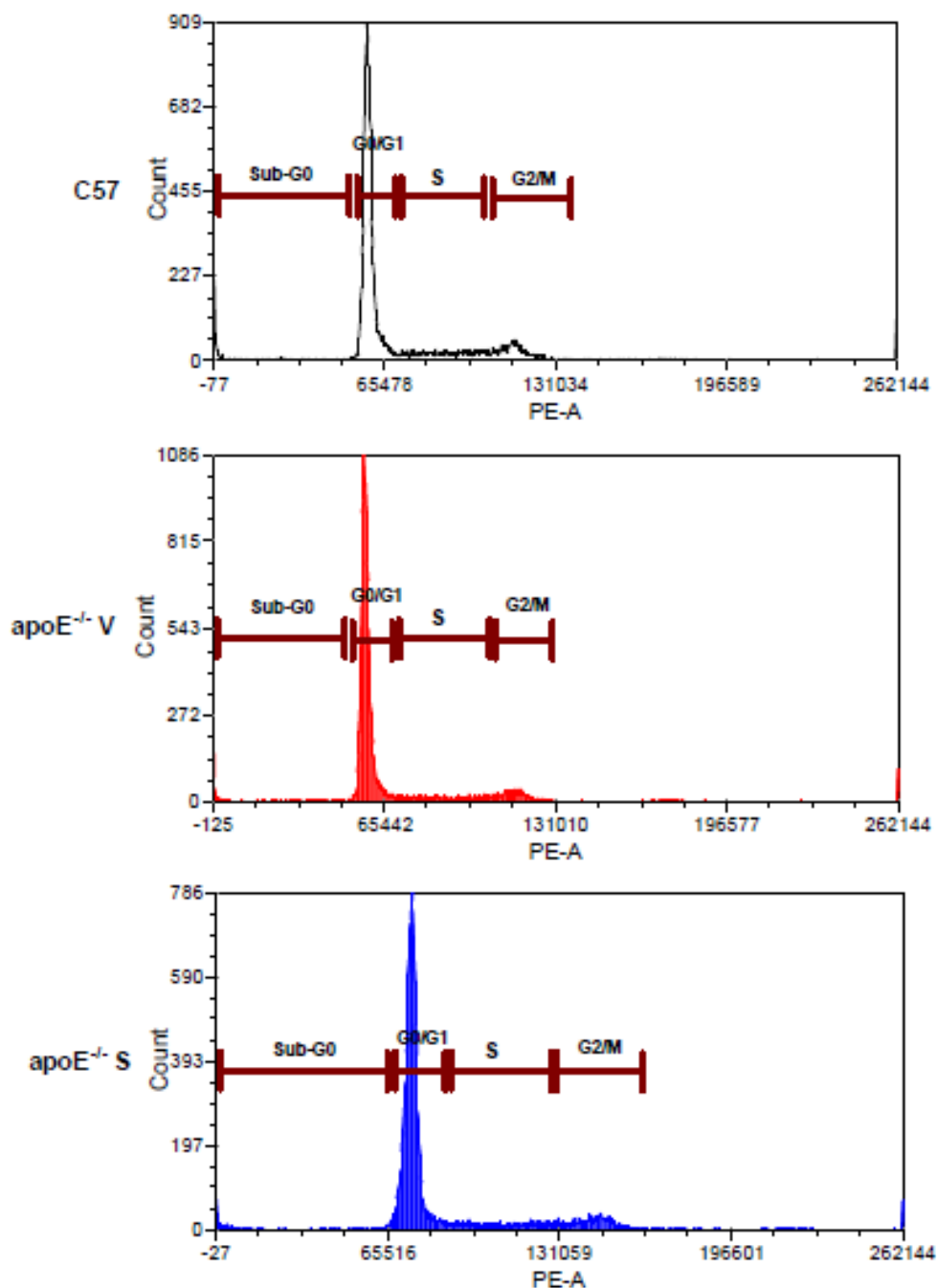
O ciclo celular corresponde ao conjunto de eventos que ocorrem com qualquer célula viva que possui núcleo e confere informações importantes com respeito à normalidade funcional-fisiológica e a propriedades celulares.

A análise do ciclo celular em nossa pesquisa visou identificar a proporção de células com DNA fragmentado nas amostras de células isoladas de medula óssea e também estimar o percentual de células nos diferentes momentos do ciclo celular.

As fases do ciclo celular (Sub-G₀, G₀/G₁, S e G₂/M) das células de medula óssea foram analisadas por citometria de fluxo pelo método de marcação com iodeto de propídeo (PI) o qual se intercala no DNA e nos permite identificar em que fase do ciclo cada célula única se encontra. Por esse motivo a aquisição das amostras no citômetro foi feita no modo *Low*, no qual um valor máximo de 200 eventos por segundo eram adquiridos e os histogramas gerados em escala linear. A avaliação dos histogramas e dos valores percentuais de células nas diferentes fases foram analisados e calculados com o auxílio do *software FCS Express 4*.

Como representado pelos histogramas da Figura 9, o perfil geral do ciclo celular é o mesmo nos diferentes grupos, sendo possível identificar as diferentes fases do ciclo celular em sua sequência esperada (Sub-G₀ seguida da fase G₀/G₁, seguida da fase S, que antecipa a G₂/M). Além disso, a porcentagem de células que se encontra em cada fase do ciclo fica acessível.

Figura 9 – Histogramas típicos do ciclo celular obtidos pela marcação com PI em células de medula óssea nos diferentes grupos de estudo.

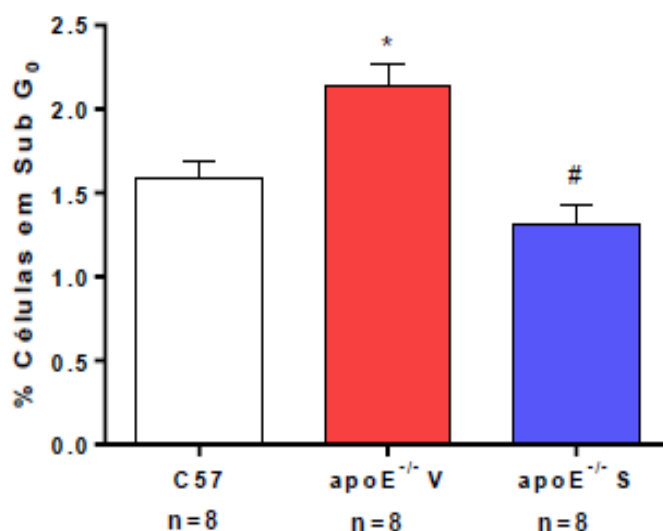


Nota: Histogramas dos grupos representados por cores diferentes, sendo controle (em preto não preenchido), veículo (vermelho) e tratado (azul). Eixo X: intensidade de fluorescência emitida por PI (interpretado pelo filtro PE-A); eixo Y, número de células marcadas (*Count*). Escala linear.

Ao analisar as fases do ciclo celular separadamente, nota-se que existem diferenças importantes entre os grupos. Com relação à fase Sub-G₀ a qual

indica DNA fragmentado, os valores obtidos pela marcação com PI apontaram para uma maior fragmentação de DNA nos animais do grupo veículo com relação ao controle e ao tratado ($\text{apoE}^{-/-}$ V: $2,14 \pm 0,12^*$ versus C57: $1,59 \pm 0,10$ versus $\text{apoE}^{-/-}$ S $1,31 \pm 0,11^\#$) (Gráfico 9).

Gráfico 9 – Quantidade de células na fase Sub- G_0 .

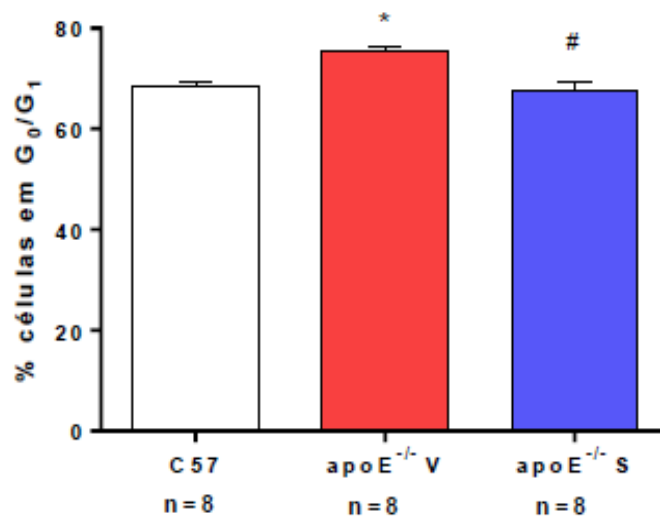


Valores expressos como média \pm EPM. *p<0,05 versus grupo controle. $^\#$ p<0,05 versus grupo veículo. (ANOVA uma via, *post hoc* Fisher).

No ciclo celular as células que não estão se dividindo permanecem por mais tempo em quiescência (fase G_0) e dependendo dos estímulos ambientais elas saem de G_0 e seguem para G_1 , momento em que as proteínas intracelulares e os precursores da duplicação se preparam para a divisão celular.

Pela análise do ciclo celular constatou-se no grupo veículo uma maior proporção de células de medula óssea no momento G_0/G_1 ($\text{apoE}^{-/-}$ V: $75,45 \pm 0,70^*$ versus C57: $68,60 \pm 0,53$ versus $\text{apoE}^{-/-}$ S: $67,75 \pm 1,60^\#$) (Gráfico 10).

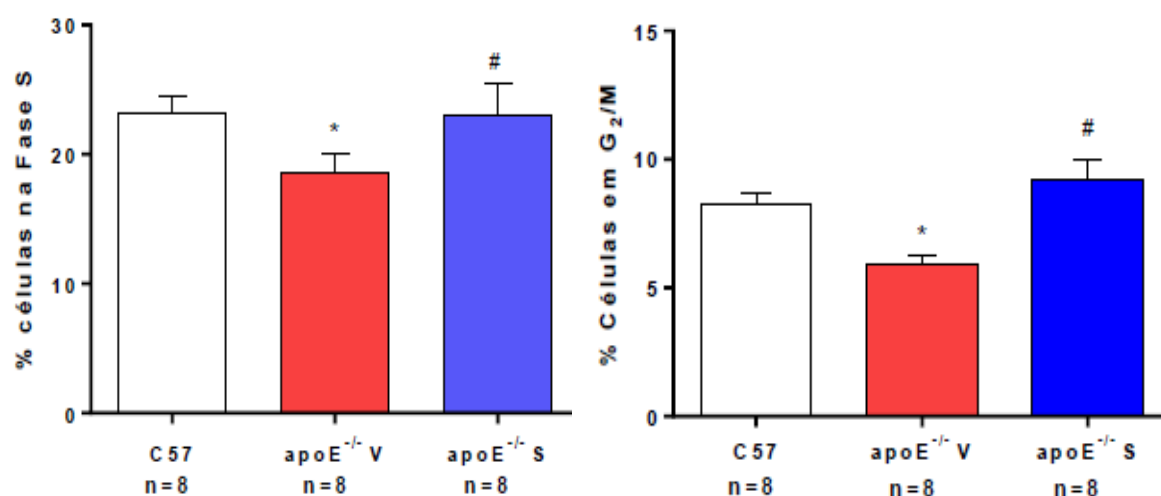
Gráfico 10 – Quantidade de células na fase G_0/G_1 .



Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ versus grupo controle. # $p < 0,05$ versus grupo veículo. (ANOVA uma via, *post hoc Fisher*).

Ao confrontar a proporção de células em G_0/G_1 com aquelas na fase S e na fase de G2/M observa-se coerência nos resultados, pois, conforme podemos observar nos Gráficos 11 e 12 abaixo, os grupos que apresentaram maior proporção de células sintetizando DNA e entrando em mitose (grupo C57 e grupo apoE^{-/-} S) são os mesmos que apresentaram menor percentual de células quiescentes.

Gráficos 11 e 12 – Percentual de Células na fase S e na fase G₂/M do ciclo celular.



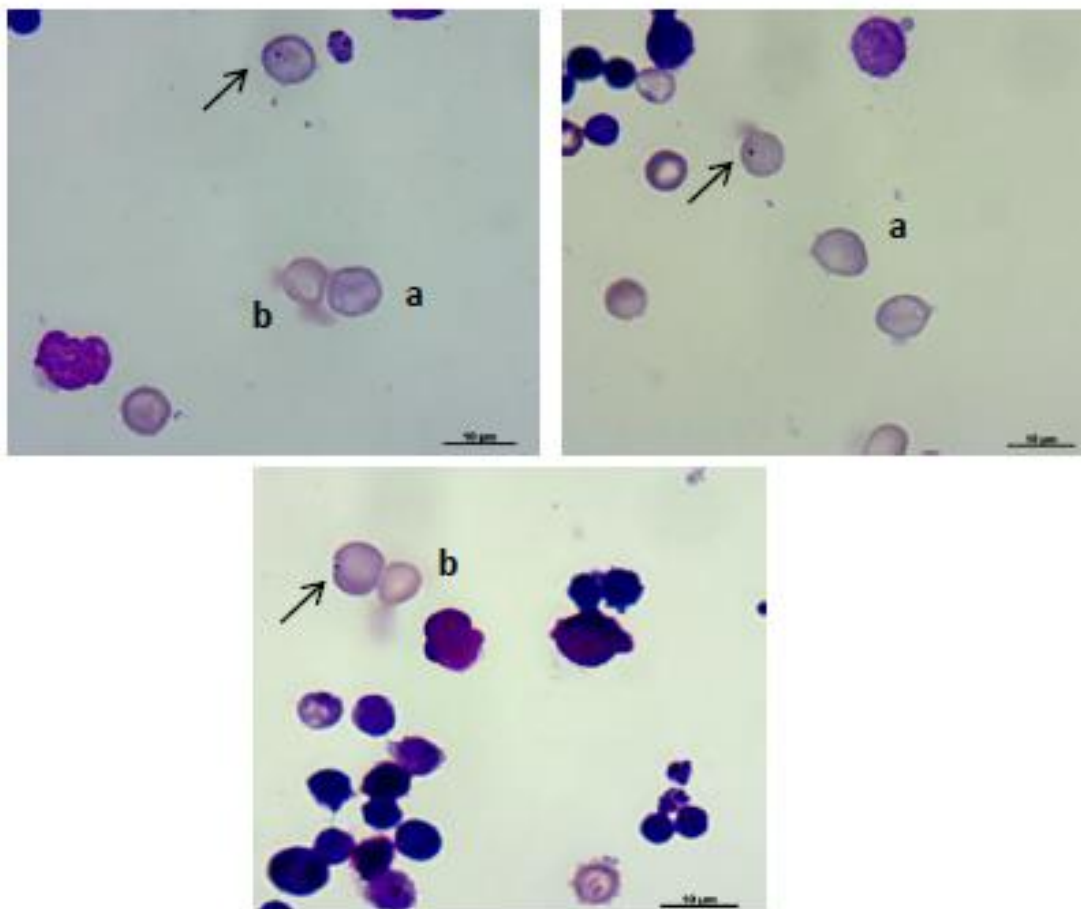
Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ versus grupo controle. # $p < 0,05$ versus grupo veículo. (ANOVA uma via, *post hoc* Fisher).

5.4 Estimativa de Dano no material genético - Teste do Micronúcleo

5.4.1 Micronúcleo na Medula óssea

Os resultados de Micronúcleo (mutagenicidade) na medula óssea foram adquiridos pela contagem de 2000 Eritrócitos Policromáticos (EPC) por animal, sendo 1000 células em cada lâmina. Foram utilizados 07 animais por grupo e registrados o número de EPC que continham micronúcleo em seu interior. A Figura 4 representa algumas fotos típicas que retratam os Eritrócitos Policromáticos (EPC), Eritrócitos Normocromáticos (ENC) e Eritrócitos Policromáticos micronucleados (EPC MN).

Figura 10 – Microscopia óptica em maior aumento de EPC, ENC e EPC MN. Células acompanhadas da letra a são EPC; células acompanhadas da letra b são ENC; as setas indicam os EPC MN.



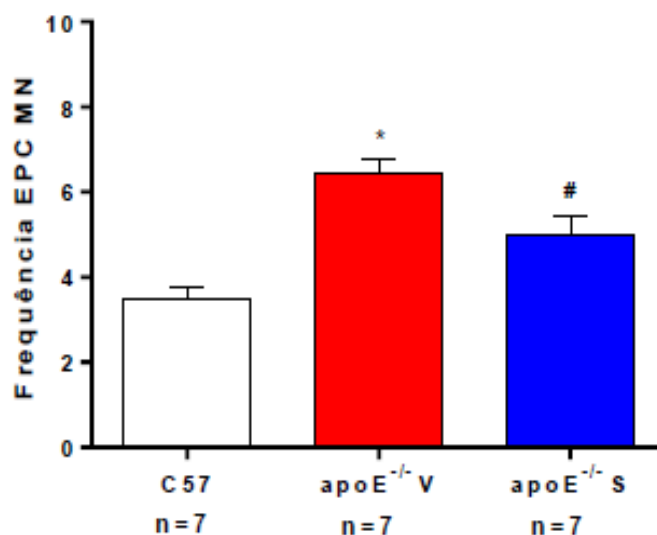
Na Medula óssea, concomitantemente à análise de mutagenicidade, foi feita a estimativa de citotoxicidade adquirida pelo cálculo da frequência de EPC e ENC nas primeiras 200 células observadas na lâmina. Os resultados obtidos nas leituras das lâminas estão sumarizados na Tabela 2 e demonstrados nos Gráficos 13 e 14 abaixo:

Tabela 2 - Frequência de EPC MN em 1000 EPC e Relação de EPC/(EPC+ENC). Contadas 2000 células por animal (1000 céls/lâmina). Dados expressos como Média \pm EPM.

GRUPOS	n	EPC MN	Razão EPC / (EPC+ENC)
C57 (Controle)	7	3,5 \pm 0,27	0,52 \pm 0,01
apoE ^{-/-} Veículo	7	6,4 \pm 0,35 ^A	0,28 \pm 0,03 ^A
apoE ^{-/-} Sildenafil	7	5,0 \pm 0,41 ^{A,B}	0,42 \pm 0,02 ^{A,B}

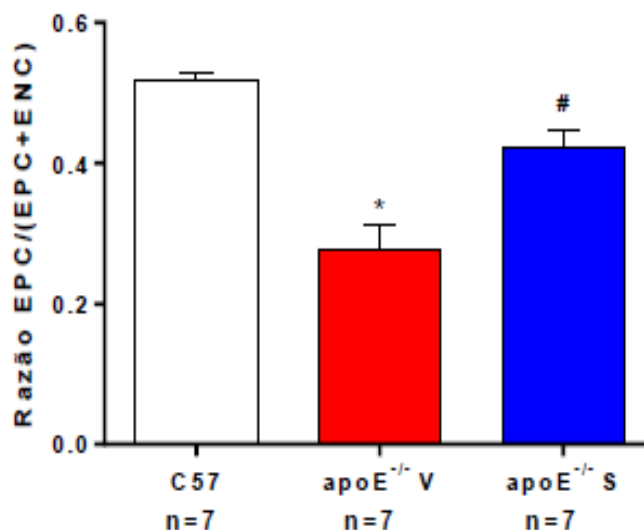
Nota: ^Ap < 0,05 versus grupo controle, ^Bp < 0,05 versus grupo Veículo. (ANOVA uma via, *post hoc* Tukey).

Gráfico 13 - Frequência de EPC MN observada em 1000 EPC contados.



Dados expressos como Média \pm EPM. *p < 0,05 versus grupo controle. #p < 0,05 versus grupo controle e versus grupo veículo. (ANOVA uma via, *post hoc* Tukey).

Gráfico 14 – Relação de EPC/(EPC+ENC) obtida pela contagem das 200 primeiras células observadas na lâmina.



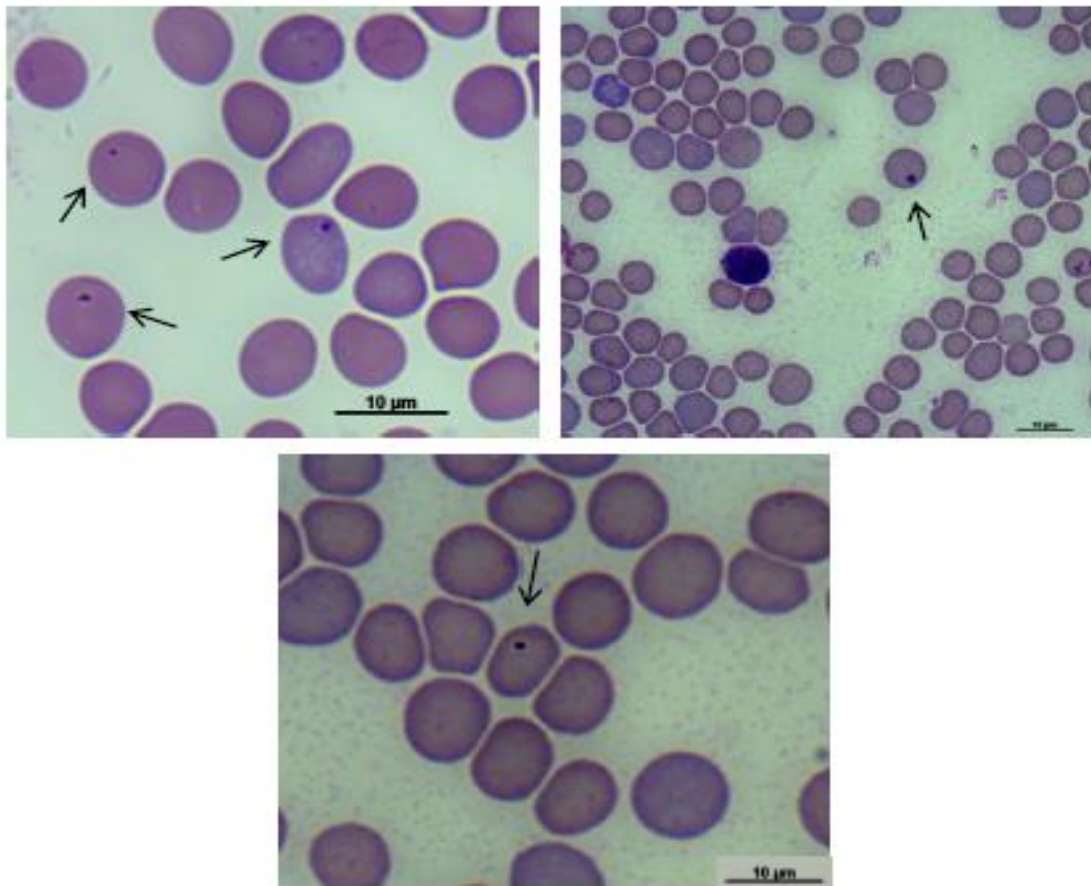
Dados expressos como Média \pm EPM. * $p < 0,05$ versus grupo controle. # $p < 0,05$ versus grupo controle e versus grupo veículo. (ANOVA uma via, *post hoc* Tukey).

5.4.2 Micronúcleo no sangue

No sangue o Teste do Micronúcleo foi realizado com sangue periférico retirado da veia caudal no início (T0) e final (TF) do período de tratamento/veículo. A análise foi feita com ENC já que os EPC da medula óssea geralmente duram cerca de algumas horas e não alcançam a corrente sanguínea.

Foram utilizados 10 animais por grupo e contados 2000 ENC por animal, sendo 1000 células por lâmina e também foram registrados quantos ENC possuíam micronúcleo (ENC MN). A Figura 5 representa ENC encontrados no esfregaço do sangue e alguns ENC MN.

Figura 11 – Microscopia óptica em maior aumento de ENC obtidos por esfregaço de sangue periférico. As setas indicam os ENC MN presentes nas amostras.



Os dados obtidos na análise do sangue estão sumarizados na Tabela 3 e representados pelos Gráficos 15 e 16 abaixo:

Tabela 3 - Frequência (Média \pm EPM) do número de ENC MN em 1000 ENC de camundongos C57, apoE^{-/-} V e apoE^{-/-} S nos momentos T0 (1º dia de tratamento/veículo) e TF (último dia de tratamento). Contados 2000 ENC por animal, 1000 por lâmina.

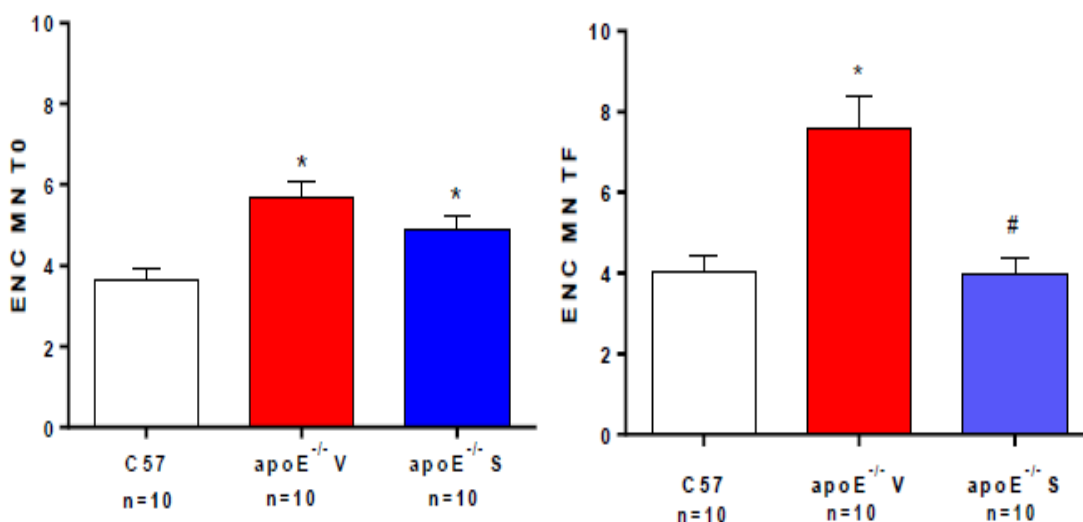
GRUPOS	n	Número de Células Micronucleadas	
		ENC MN T0	ENC MN TF
C57 (Controle)	10	3,65 \pm 0,29	4,0 \pm 0,37
apoE ^{-/-} Veículo	10	5,70 \pm 0,35 ^A	7,6 \pm 0,80 ^{A, a}
apoE ^{-/-} Sildenafil	10	4,90 \pm 0,34 ^A	3,95 \pm 0,40 ^B

Nota: letras maiúsculas referem-se às diferenças entre os grupos (observar na mesma coluna)

^A p < 0,05 versus grupo controle, ^B p < 0,05 versus grupo veículo (ANOVA uma via, *post hoc* Tukey).

Letras minúsculas referem-se às diferenças dentro do mesmo grupo em dois momentos diferentes: T0 e TF. (observar na mesma linha). ^a p < 0,05 versus grupo veículo no tempo 0 de tratamento/ veículo. (Test t para amostras independentes).

Gráficos 15 e 16 - Quantidade de ENC MN encontrados em esfregaço de sangue periférico no início do tratamento/veículo (T0) e após 21 dias de tratamento (TF).



Dados expressos como Média \pm EPM. *p<0,05 versus grupo controle. #p<0,05 versus grupo veículo. (ANOVA uma via, *post hoc* Tukey).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 Colesterol Plasmático e Triglicerídeos

Recentemente dados publicados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que as células mononucleares de medula óssea de camundongos apoE^{-/-} apresentaram danos oxidativos relativos ao aumento de ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio em animais jovens e idosos, bem com danos genotóxicos no DNA, evidenciando a influência da hipercolesterolemia sobre o estresse oxidativo (TONINI et al., 2013).

No presente trabalho nós testamos a hipótese de que o tratamento com Sildenafil seria capaz de melhorar alguns danos que a hipercolesterolemia comprovadamente causa nas células de medula óssea de camundongos apoE^{-/-} *knockout*.

Em nosso estudo os animais dos grupos experimentais (apoE^{-/-} V e apoE^{-/-} S) apresentaram níveis de colesterol total e triglicerídeos plasmáticos bastante elevados em comparação ao grupo controle (C57), indicando que os animais apoE^{-/-} utilizados nesta pesquisa eram de fato hipercolesterolêmicos.

Interessantemente, os animais que receberam Sildenafil (grupo apoE^{-/-} S) por três semanas não tiveram seus níveis lipídicos e de triglicérides alterados em comparação ao grupo apoE^{-/-} que recebeu veículo, indicando que o medicamento provavelmente não age por vias do metabolismo lipídico.

Em nosso grupo de pesquisa também já foi demonstrado que animais apoE^{-/-} tratados com Sildenafil (40 mg/kg/dia) por três semanas não apresentaram alterações lipídicas em comparação ao grupo experimental que recebeu veículo (BALARINI et al., 2013; LEAL et al., 2015).

Está mais do que demonstrado em animais, estudos epidemiológicos e investigações clínicas que altas concentrações de colesterol circulante promovem a aterosclerose (HANSSON; HERMANSSON, 2011) e podem ocasionar danos nos mais diferentes órgãos como, por exemplo, na medula óssea.

6.2 Níveis de ERO's

Neste estudo, os resultados relativos as ERO's demonstraram que tanto o ânion superóxido, avaliado pela marcação com DHE, como o peróxido de hidrogênio, avaliado pela marcação com DCF-DA estavam aumentados em animais com hipercolesterolemia (grupo apoE^{-/-} V). Em contrapartida, o grupo hipercolesterolêmico que recebeu Sildenafil por três semanas apresentou quantidades similares de $\cdot\text{O}_2^-$ e H_2O_2 ao controle (grupo C57).

Esses resultados indicam que animais com níveis lipídicos elevados realmente apresentam maior produção de ERO's, pelo menos de $\cdot\text{O}_2^-$ e H_2O_2 em específico e possuem uma tendência ao desenvolvimento do estresse oxidativo.

Concomitantemente também fica perceptível o fato de o Sildenafil, de alguma forma, ter interferido no estabelecimento do estresse oxidativo nos animais tratados, seja ao prevenir a formação dessas ERO's em questão seja ao agir como fator antioxidante, retirando as ERO'S formadas.

O Sildenafil, utilizado em maior escala no tratamento da disfunção erétil e da hipertensão pulmonar, desenvolve outros efeitos mais abrangentes no organismo. Um dos efeitos benéficos do Sildenafil está no balanço oxidativo, por diminuir o estresse oxidativo nos eventos inflamatórios (MORANO et al., 2007; YILDIRIM et al., 2010) e inibir a geração de EROs (HEMNES; ZAIMAN; CHAMPION, 2008).

Dados publicados recentemente por nosso grupo de pesquisa confirmam e reforçam o efeito antioxidante do Sildenafil, pela diminuição da produção de ERO's (BALARINI et al., 2013; DIAS et al., 2014; LEAL et al., 2015; ALMEIDA, 2015) e também dos níveis de peroxidação lipídica, que está diretamente relacionada ao estresse oxidativo (FAHNING et al., 2015).

O acúmulo de GMPc proporcionado pelo Sildenafil pode ser um dos motivos pelo qual ocorre diminuição do estresse oxidativo, pois, de acordo com Curatola, Xu e Hendricks-Munoz (2011) o GMPc possui efeito protetor contra o estresse oxidativo.

Em níveis fisiológicos as ERO's funcionam como moléculas mensageiras que sinalizam respostas biológicas como, por exemplo, a proliferação celular, migração, sobrevivência, diferenciação e a expressão gênica. Por outro lado, o excesso de ERO's que culmina com o estresse oxidativo pode ser prejudicial e induzir várias patologias como, a aterosclerose, insuficiência cardíaca, diabetes e câncer (USHIO-FUKAI; REHMAN, 2014).

No ambiente da medula óssea a ação das ERO's varia grandemente de acordo com o microambiente de cada linhagem celular, chamado por diversos autores de *nicho celular*. A saber, geralmente níveis baixos de ERO's podem manter a quiescência de células hematopoiéticas, enquanto altos níveis de ERO's contribuem para a proliferação, senescência ou apoptose, levando a uma exaustão prematura do processo de auto-renovação nesse tipo celular. Em contrapartida, níveis fisiológicos de ERO's também são cruciais para processos de reparo que envolvem diferenciação celular e mobilização das células tronco/progenitoras da medula óssea, bem como para a manutenção da imunidade celular durante o estado de equilíbrio e também durante condições de estresse (PERVAIZ; TANEJA; GHAFARI, 2009).

O nicho das células-tronco hematopoiéticas (CTH) quiescentes, que são consideradas as células-tronco hematopoiéticas mais primitivas e responsáveis por manter a população em longo prazo, é caracterizado por baixo teor de oxigênio. Esse microambiente hipóxico supostamente assegura às CTH uma proteção contra o estresse oxidativo e a maior capacidade de manter a característica de auto-renovação (JANG; SHARKIS, 2007).

Nas células-tronco mesenquimais não há produção substancial de ERO's e, por esse motivo, muitas vezes elas são utilizadas para se estudar o acúmulo de ERO's (LAVADO et al., 2015).

É importante lembrar que a medula óssea é fonte de todos os outros tipos celulares, inclusive dos leucócitos sanguíneos que participam do processo inflamatório e dos fatores e células, como as progenitoras endoteliais, que são recrutados na tentativa de prevenir danos permanentes no organismo em diferentes situações. Assim, a produção de ERO's na medula óssea implica em

eventos adversos e importantes no destino das CTH e o excesso de ERO's é considerado tóxico para as células da medula óssea.

As células-tronco, tanto as pluripotentes como as multipotentes, mantêm sua identidade genômica por meio da manutenção dos níveis de ERO's sob controle, o que é alcançado pela defesa antioxidante, bem como pela alta expressão de genes antioxidantes, por um sistema de reparo de DNA mais potente e pela expressão de proteínas *heat shock*, induzidas em situações de estresse (CHAUDHARI; YE; JANG, 2014).

6.3 Análise das fases do ciclo celular

Em nossos resultados, a maior produção de ERO's no grupo apoE^{-/-} V foi refletida nas diversas fases do ciclo celular das células de medula óssea. Primeiramente houve no grupo apoE^{-/-} V maior quantidade de DNA fragmentado.

Os animais do grupo veículo também apresentaram maior porcentagem de células em G₀/G₁ e menor proporção de células entrando na fase S e na mitose (fase G₂/M). Ou seja, nos animais doentes (apoE^{-/-}) que não receberam tratamento, maior proporção de células não está conseguindo entrar no processo de divisão celular, nem mesmo na síntese de DNA realizada na fase S do ciclo.

Esses eventos podem estar diretamente relacionados ao maior estresse oxidativo observado nos resultados do grupo veículo, devido aos altos níveis de $\cdot\text{O}_2^-$ e H_2O_2 detectados por citometria de fluxo.

Como dito anteriormente ERO's podem afetar as características das células ao ponto de modificar a taxa proliferativa, de diferenciação, apoptose e envelhecimento e/ou exaustão da auto-renovação.

As ERO's, especialmente o radical hidroxil, reagem com os componentes da molécula de DNA, danificando as bases purinas e pirimidinas e a estrutura da desoxirribose, levando a quebras em fita simples ou em fita dupla e a ligações

cruzadas na estrutura do DNA (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2010; VALKO et al., 2007). As ERO's podem ainda influenciar modificações epigenéticas por meio da oxidação do DNA (SARDINA et al., 2012).

Notadamente, o aumento na produção de $\cdot O_2^-$ induz a danos no DNA, além de inflamação e envelhecimento vascular (CSISZAR et al., 2009). Os danos no DNA podem levar tanto à parada quanto à indução da transcrição, e também à indução de vias sinalizadoras de tradução, a erros de replicação e instabilidade genômica (MARNETT, 2000).

Como visto em nossos resultados, animais com maior produção de H_2O_2 ($apoE^{-/-}$) apresentaram menos células proliferando e entrando em divisão celular, informação que apoia os resultados encontrados por Xiao e outros (2014), os quais mostraram que o peróxido de hidrogênio inibe a proliferação e a diferenciação endotelial de células tronco de medula óssea parcialmente via produção de ERO's.

Em revisão detalhada sobre o assunto, Sart, Song e Li (2015) fizeram um levantamento de vários aspectos relacionados à influencia do estresse oxidativo na sobrevivência das células-tronco e reafirmam que níveis basais de ERO'S são requeridos na ativação de diversas vias celulares de proliferação e sobrevivência enquanto o acúmulo excessivo de ERO's leva ao dano celular.

Todos esses fatos permitem-nos especular que as células de medula óssea dos animais $apoE^{-/-}$ de fato estão sob influência da maior quantidade de ERO's, de modo que suas populações provavelmente não conseguem seguir o curso normal da divisão celular para reabastecer os locais de demanda ou para a própria auto-renovação. A maior quantidade de DNA fragmentado nesse grupo de animais seria uma evidência fortalecedora desse resultado.

Por outro lado, ao analisar conjuntamente os resultados do estresse oxidativo com a ação do Sildenafil, observa-se que os animais doentes que receberam tratamento com Sildenafil por três semanas ($apoE^{-/-}$ S) apresentaram resultados semelhantes aos encontrados nos animais do grupo sadio (C57). Com menor presença de ERO's nas células de medula óssea, o grupo $apoE^{-/-}$ S obteve uma maior proporção de células entrando no período de síntese de DNA e na

mitose propriamente dita. Também houve menor proporção de DNA fragmentado nos animais tratados com Sildenafil.

Os resultados sugerem que, de alguma forma, o tratamento com Sildenafil durante três semanas foi suficiente para gerar uma proteção às células de medula óssea contra os danos causados pelo estresse oxidativo. Ou seja, o Sildenafil provavelmente agiu como um agente antioxidante e protetor de forma eficaz, o que se refletiu nas características do ciclo celular.

Foresta e outros (2005, 2007) sugeriram que inibição da PDE5 influencia no mecanismo de mobilização das células-tronco progenitoras de medula óssea, pois, em suas pesquisas ficou evidenciado que o número de células progenitoras circulantes é reduzido em pacientes com risco cardiovascular e o tratamento com inibidor da PDE5 (Vardenafil), aumenta os níveis de células progenitoras circulantes, possivelmente devido ao aumento dos níveis de GMPc.

6.4 Estimativa de Dano no material genético - Teste do Micronúcleo

Ao traçar um paralelo entre os resultados das ERO's entre os diferentes grupos estudados nesta pesquisa com os resultados de dano genotóxico obtido pelo teste do micronúcleo, observa-se uma continuidade dos efeitos das ERO's nos animais doentes que não receberam tratamento com Sildenafil (apoE^{-/-} V). Os animais apoE^{-/-} V não apenas apresentaram maiores níveis de ERO's mas também maior quantidade de células com micronúcleo.

Em nosso trabalho o intuito do teste do micronúcleo foi verificar os possíveis danos genéticos decorrentes dos fatores relacionados à hipercolesterolemia bem como analisar a influência do Sildenafil nesses possíveis danos.

O que pôde ser evidenciado foi que animais com hipercolesterolemia de fato apresentaram mais micronúcleos do que animais saudáveis, sugerindo que os animais hipercolesterolêmicos manifestam certo grau de dano genotóxico. Ademais, o grupo doente também apresentou desproporção na produção de

eritrócitos policromáticos (EPC), o que é condizente com danos citotóxicos e também corroboram o resultado de menor proliferação que o grupo apoE^{-/-} V apresentou e que foi observado no ciclo celular.

No grupo tratado (apoE^{-/-} S) o número de micronúcleos foi mantido próximo àquele do controle, sugerindo que o Sildenafil foi capaz de prevenir a evolução do dano genotóxico nos animais doentes, possivelmente agindo de forma quimioprotetora. Igualmente positiva, a proporção de EPC produzidos permaneceu estável e a relação de EPC/ENC manteve-se no equilíbrio esperado que é de 1:1.

Em conjunto, nossos resultados apontam para uma evidente sequência de eventos relacionados à hipercolesterolemia, com ação nas células de medula óssea no que diz respeito ao aumento do estresse oxidativo e do dano ao material genético, apontado aqui pela análise do ciclo celular e pela quantidade de micronúcleos nos animais doentes (apoE^{-/-}).

Concomitantemente, foi elucidado o papel do tratamento crônico com Sildenafil nesses animais doentes. Possivelmente por meio da diminuição da produção de ERO's nas células de medula óssea dos animais apoE^{-/-} S, o Sildenafil agiu de forma quimioprotetora contra os efeitos do estresse oxidativo, tais quais: a fragmentação do DNA, a parada irregular do ciclo celular e os danos mutagênicos e citogenéticos.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

No presente trabalho ficou evidenciado que o tratamento com o inibidor da PDE5 (Sildenafil) por três semanas em camundongos hipercolesterolêmicos (apoE^{-/-}) trouxe influências sobre a dinâmica de manutenção das células de medula óssea, bem como de seu equilíbrio redox e danos mutagênicos e citotóxicos.

Podem ser pontuadas as seguintes situações:

- ✓ As células de medula óssea dos animais hipercolesterolêmicos possuem maior produção de ERO'S;
- ✓ O tratamento crônico com Sildenafil foi capaz de diminuir a produção de ERO'S;
- ✓ Os animais hipercolesterolêmicos apresentaram maior fragmentação de DNA e mais células impedidas de ciclar
- ✓ O Sildenafil mostrou-se eficaz na prevenção da fragmentação do DNA e na manutenção dos padrões proliferativos visto que as células dos animais tratados apresentaram menor proporção de DNA fragmentado e também conseguiam seguir nas etapas do ciclo celular e entrar em divisão;
- ✓ Os animais hipercolesterolêmicos apresentaram maior número de células com micronúcleo, sugerindo danos mutagênicos/genotóxicos e também obtiveram relação negativa de EPC/ENC o que sugere prejuízo citotóxico;
- ✓ O tratamento com Sildenafil preveniu o aparecimento de micronúcleos no decorrer do período de três semanas, bem como foi benéfico na produção equilibrada de EPC, garantindo que a razão EPC/ENC se mantivesse próxima de 1, o que evidencia ausência de citotoxicidade.

Em conjunto, todos os resultados pontuados sugerem o Sildenafil como fator quimioprotetor contra danos ao material genético, provavelmente devido à diminuição do estresse oxidativo, via mecanismos antioxidantes que acompanham a farmacodinâmica do medicamento.

8 Limitações do Estudo

A importante ação do tratamento com o Sildenafil em células de medula óssea dos camundongos hipercolesterolêmicos mostrou eficácia na prevenção do estresse oxidativo, na manutenção das características do ciclo celular e na proteção contra danos mutagênicos e citogenéticos.

Todavia é necessário ressaltar que esses efeitos foram decorrentes de um período de tratamento específico, no caso, 21 dias, considerado por alguns autores como tratamento crônico e por outros como subcrônico.

Para que os mesmos efeitos fossem mantidos no organismo *in vivo* seria necessário, em tese, a manutenção da medicação por tempo indeterminado, o que é um fator limitante e inapropriado no caso do Sildenafil, considerando seus diferentes efeitos e sua farmacodinâmica.

Referências

REFERÊNCIAS

V DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. **Revista da Sociedade Brasileira de Cardiologia**. v. 101, n. 4, (supl.1), 2013.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 23, p. 1420-1458.

ALMEIDA, L. S. **Sildenafil previne a nefropatia induzida por contraste em ratos wistar**. 2015. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2015.

ARAUJO, J. D. et al. Células-tronco de medula óssea em isquemia crítica de membros. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 31 (Supl.1): 128-139. 2009.

AU, A. et al. Ups and Downs of Viagra: revisiting ototoxicity in the mouse model. **Plos One**. 8 (11). 2013.

AVERSA, A. et al. Chronic administration of Sildenafil improves markers of endothelial function in men with type 2 diabetes. **Diabetic Medicine**. 25. 37-44. 2007.

BALARINI, C. M. et al. Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse. **Journal of Translational Medicine**, 11:3. 2013.

BARRETO, S. M. et al. Quantificando o risco de doença arterial coronariana na comunidade. O projeto Bambuí. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 81, n. 6, p. 549-555, 2003.

BERLINER, J. A. et al. Atherosclerosis: basic mechanisms, oxidation, inflammation and genetics. **Circulation**. v. 91 (9).p.2488-2496. 1995.

BERRA, C. M.; MENCK, C. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**. v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

BONASSI, S. et al. Na increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**. v. 28, n. 3, p. 625-631, 2007.

BRASIL - [brasil.gov.br](http://www.brasil.gov.br) - Ministério da Saúde/ Sociedade Brasileira de Cardiologia. Portal Brasil / Saúde/ Ministério da Saúde. <http://www.brasil.gov.br/sobre/saude/saude-do-homem/doencas-cardiovasculares> - Acesso em 17/03/13

BRITO, P. M. **Papel do resveratrol no contexto da prevenção da aterosclerose: mecanismos moleculares envolvidos na apoptose e proliferação celular**. 2007. 181 f. Tese de Doutorado – Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra e Instituto INSERM unidade 858, Toulouse, França. Lisboa, Portugal. 2007.

CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular disease: the role of oxidant stress. **Circulation Research**. v. 87, p. 840–844, 2000.

CHAU, V. Q. et al. Mitigation of the progression of heart failure with sildenafil involves inhibition of RhoA/Rho-Kinase pathway. **American Journal of Physiology**. v. 300, p. H2272-H2279, 2011.

CHAUDHARI, P.; YE, Z.; JANG, Y-Y. Roles of reactive oxygen species in the fate of stem cells. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 20, n. 12, p. 1-10. 2014.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de Laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 28, n. 1, p.11-23. 2007.

COOPER, C. E. et al. Exercise, free radicals and oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**. v. 30, n. 2, p. 280-285, 2002.

CORBIN, J. D. Mechanisms of action of PDE5 inhibition in erectile dysfunction. **International Journal of Impotence Research**. v. 16, p. S4-S7, 2004.

CSISZAR, A. et al. Oxidative stress and accelerated vascular aging: implications for cigarette smoking. **National Institutes of Health**. v. 14, p. 3128-3144, 2009.

CURATOLA, A. M.; XU, J.; HENDRICKS-MUNOZ, K. D. Cyclic GMP protects endothelial progenitors from oxidative stress. **Angiogenesis**. v. 14, p. 267-279, 2011.

DIAS, A. T. et al. Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension. **Journal of Translational Medicine**. v. 12, n. 35, p. 1-11, 2014.

DONATO, M. A. et al. **Além da Disfunção Erétil**. Cadernos de Graduação – Ciências Biológicas e da Saúde. Facipe. v. 1, n2, 11-22p. 2013.

DOTSENKO, O. Stem/progenitor Cells, atherosclerosis and cardiovascular regeneration. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**. v. 4, p.97-104. 2010.

DUSSAULT, S. et al. Sildenafil increases endothelial progenitor cell function and improves ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic apolipoprotein E -deficient mice. **Hypertension**. 54:1043-1049; 2009.

ELSHOURBAGY, N. A. et al. 1985. Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 82, p. 203-207, Jan. 1985.

ESSAYAN, D. M. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) inhibitors and immunomodulation. **Biochemical Pharmacology**. v. 57, n. 9, p. 965-973, 1999.

FAHNING, B. et al. Sildenafil improves vascular endothelia structure and function in renovascular hypertension. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v. 16, n. 9, p. 823-831, 2015.

FINK, A. H. et al. Sildenafil for male erectile dysfunction: a systematic review and meta-analysis. **American Medical Association**. 2002.

FINKEL, T. Oxidant signals and oxidative stress. **Current Opinion in Cell Biology**. v.15, .247–254, 2003.

FORESTA, C. et al. Relationship between vascular damage degrees and endothelial progenitor cells in patients with erectile dysfunction: effect of vardenafil administration and pde5 expression in the bone marrow. **European Urology**. v. 51, p. 1411-1419. 2007.

GALARIS, D.; MANTZARIS, M.; AMORGIANIOTIS, C. Oxidative stress and aging: the potential role of iron. **Hormones**. v. 7, n. 2, p.114-122, 2008.

GILLIES, H. C.; ROBLIN, D.; JACKSON, G. Coronary and systemic hemodynamic effects of sildenafil citrate: from basic science to clinical studies in patients with cardiovascular disease. **International Journal of Cardiology**. v. 86, 131-141. 2002.

GIORDANO, D. et al. Expression of cGMPbinding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in mouse tissues and cell lines using and antibody against the enzyme-terminal domain. **Biochim Biophys Acta**. 1539:16–27. 2001.

GLOSSMANN, H.; PETRISCHOR, G.; BARTSCH, G. Molecular mechanisms of the effects of sildenafil (VIAGRA®). **Experimental Gerontology**. 34. 305–318. 1999.

GOKAKIN, A. K. et al. The protective effects of sildenafil in acute lung injury in a rat model of severe scald burn: a biochemical and histopathological study. **Burns**. v. 39, p. 1193-1199, 2013.

GRUNDY, S. M. et al. Assessment of cardiovascular risk by use of multiplierisk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. **Circulation**. v. 100, p. 1481-92. 1999.

GUARITA-SOUZA, L. C. et al. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**. v. 20, n. 3, p. 270-278. 2005.

GUIMARÃES, A. C. et al. Uso do Sildenafil em pacientes com doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 73, n. 6, p. 515-520, 1999.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: molecules, medicines, and myths. **Biochemical and biophysical Research Communications**. v. 393, p. 561-564, 2010.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants: redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**. v. 141, p. 312–322. 2006.

HAYASCHI, M.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, J. R. M. Kinetics of micronucleus formation in relation to chromosomal aberrations in mouse bone marrow. **Mutation Research**. v. 127. p. 129-137. 1984.

HANSSON, G. K.; HERMANSSON, A. The immune system in atherosclerosis. **Nature Immunology**. v. 12, n. 3, March, 2011.

HEMNES, A. R.; ZAIMAN, A.; CHAMPION, H. C. PDE5A inhibition attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension through inhibition of ROS generation and RhoA/Rho kinase activation. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**. v. 294, n. 1, p. L24-L33, 2008.

ISERI, S. O. et al. The effect of sildenafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, on acetic acid-induced colonic inflammation in the rat. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v. 24, p.1142-1148, 2009.

JACKSON, G. et al. Effects of Sildenafil Citrate on human hemodynamics. **The American Journal of Cardiology**. v. 83 (5A), p. 13C-20C, 1999.

JANG, Y-Y.; SHARKIS, S. J. A low level of oxygen reactive species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygen niche. **Stem Cells in Hematology**. v. 110, n. 8, p. 3056-3063, 2007.

JAWIÉN, J. NASTALEK, P. KORBUT, R. Mouse models of experimental atherosclerosis. **Journal of Physiology and pharmacology**. v. 55, n. 3, p. 503-517. 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Hemocitopoese. In: _____. **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2008. Cap. 13, p. 240-253.

KAJI, E. H.; LEIDEN, J, M. Gene and stem cell therapies. Journal of American Medical Association. v. 285, n. 5, p. 545-550, 2001.

KARAKOYUN, B. et al. The effect of phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate on inflammation and apoptosis in rat experimental colitis. **Life Sciences**. v. 89, p. 402-407, 2011.

KRAUSE, W. J. Bone marrow. 2008. Disponível em: <https://mospace.umsystem.edu/xmlui/bitstream/handle/10355/969/Bone%20Marrow.pdf?sequence=1> Acesso em 25/10/2015.

KUKREJA, R. C. et al. Emerging new uses of phosphodiesterase-5 inhibitors in cardiovascular diseases. **Experimental & Clinical Cardiology**. v. 16, n. 4. p. 1-6, 2011.

LAVADO, A. S. et al. Controlled intracellular generation of reactive oxygen species in human mesenchymal stem cells using porphyrin conjugated nanoparticles. **Nanoscale - Royal Society of Chemistry**. v. 7, p. 14525-14531, 2015.

LEAL, M. A. et al. Mechanisms of enhanced vasoconstriction in the mouse model of atherosclerosis: the beneficial effects of sildenafil. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v. 16, p. 517-530. 2015.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; MASERI, M. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation. Journal of the American Heart Association**. v. 105, p. 1135-1143. 2002.

LIBBY, P.; DICARLI, M.; WEISSLEDER, R. The Vascular Biology of Atherosclerosis and Imaging Targets. **The journal of nuclear medicine**. v. 51, n. 5, 2010.

LIMA, L. C. F. et al. Mononuclear cell therapy reverts cuff-induced thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Lipids in Health and Diseases**. v. 11, n. 96, p. 1-10, 2012.

LIN, C-T. et al. Immunoreactive apolipoprotein E is a widely distributed cellular protein. Immunohistochemical localization of apolipoprotein E in Baboon Tissues. **Journal of Clinical Investigation**. v. 78, p. 947-958, Oct.1986.

LIU, J.; CAO, L.; FINKEL, T. Oxidants, metabolism, and stem cell biology. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 51, p. 2158-2162, 2011.

MADAMANCHI, N. R.; VENDROV, A.; RUNGE, M. S. Oxidative stress and vascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v. 25(1), p. 29-38, 2005.

MAHLEY, R. W.; RALL JUNIOR, S. C. Apolipoprotein E: far more than a lipid Transport Protein. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**. v. 1, p. 507-537, 2000.

MARNETT, L. J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**. v. 21, n. 3, p. 361-370, 2000.

MORANO, S. Antioxidant treatment associated with sildenafil reduces monocyte activation and markers of endothelial damage in patients with diabetic erectile dysfunction: a double-blind, placebo-controlled study. **European Association of Urology**. v. 52, p. 1769-1776, 2007.

MURPHY, M. P. et al. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. **Cell Metabolism**. 13, April 6, p. 361-366. 2011.

NAKA, K. et al. Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 10, n. 11, p. 1883-1894, 2008.

NAKAI, M. et al. Expression of apolipoprotein E mRNA in rat microglia. **Neuroscience Letters**. v. 211, p. 41-44, 1996.

NEVES, S. M. P. et al. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo: FCF-IQ/USP. 2013. 216 p.

NOVAK, E. M.; BYDLOWSKI, S. P. Biologia molecular das dislipidemias. Variação genética das apolipoproteínas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 67, n. 6, 1996.

OJOPI, E. P. B.; BERTONCINI, A. B.; DIAS NETO, E. Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**. v. 31, n. 1, 2004.

PAOLETTI, R. GOTTO JUNIOR, A. M.; HAJJAR, D. P. Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy. **Circulation**. 15;109 (23 Suppl 1):III20-6, 2004.

PERVAIZ, S.; TANEJA, R.; GHAFARI, S. Oxidative Stress Regulation of Stem and Progenitor Cells. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 11, n. 11, p. 2777-2789. 2009.

PIEDRAHITA, J. A. et al. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 89, n. 10, p. 4471-4475, 1992.

PLUMP, A. S. et al. Severe Hypercholesterolemia and Atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell**. v. 71, p. 343-353, Oct., 1992.

PORTAL BRASIL. Doenças cardiovasculares causam quase 30% das mortes no País. Disponível online. Publicado em: 06/09/2011 18h32. <http://www.brasil.gov.br/saude/2011/09/doencas-cardiovasculares-causam-quase-30-das-mortes-no-pais>. Acesso em 01/11/15.

PORTO, M. L. et al. Mononuclear cell therapy attenuates atherosclerosis in apoE KO mice. **Lipids in Health and Disease**. v. 10, n. 155, p. 1-6, 2011.

RAJA, S. G.; NAYAK, S. H. Sildenafil: emerging cardiovascular indications. **The annals of thoracic Surgery**. 78(4):1496–1506. 2004.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**. v. 2, n. 2, p. 219-236, 2007.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v. 21, n. 3, p. 133-149, Sept./Dec. 2005.

RODRIGUES, B. P. et al. Sildenafil ameliorates biomarkers of genotoxicity in an experimental model of spontaneous atherosclerosis. **Lipids in Health and Disease**. 12(1):128. 2013.

ROSS R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. **American Heart Journal**. 138(5 Pt 2):S419-20, 1999.

ROSS, M. H.; ROMRELL, L. J. **Histologia. Texto e Atlas**. 2. ed. São Paulo: Panaamericana, 1993. Cap. 9, p. 192-200.

SAMBUCETI, G. et al. Diabetes impairs the vascular recruitment of normal stem cells by oxidant damage, reversed by increases in pAMPK, heme, oxygenase-1, and adiponectin. **Stem Cells**. v. 27, p. 399-407, 2009.

SAMPAIO, R. C.; MORAES, C. Estresse oxidativo e envelhecimento: papel do exercício físico. **Revista de Educação Física**. UNESP. v. 16 [2] p506-515. 2010.

SARAIVA, K. L. A.; **Avaliação dos efeitos do inibidor da fosfodiesterase-5 (Sildenafil) sobre células de Leydig e espermatozoides de camundongos**. 2010. 123 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz em Recife. 2010.

SARDINA, J. L. et al. Reactive oxygen species: are they important for haematopoiesis? **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 81, p. 257-274. 2012.

SART, S.; SONG, L.; LI, Y. Controlling Redox Status for Stem Cell Survival, Expansion, and Differentiation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2015, 2015.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 38, p. 995-1014, 2005.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**. v. 31. p. 9-15, 1975.

SCHWARZ, E. R. et al. The effects of chronic phosphodiesterase-5 inhibitor use on different organ systems. **International Journal of Impotence Research**. v. 19, 139-148. 2007.

SESA – Secretaria Estadual de Saúde do Espírito Santo. Plano Estadual de Saúde 2012-2015. p. 45-46. 2012.

SODERLING, S. H.; BAYUGA, S. J.; BEAVO, J. A. Identification and Characterization of a Novel Family of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 273, n. 25, p. 15553-15558, 1998.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F. Role of oxidative modification in atherosclerosis. **Physiological Reviews**. v. 84, p1381-1478. 2004.

TRAVLOS, G. S. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. **Toxicologic Pathology**. v. 34, p. 548-565, 2006.

TERRETT, N. K. et al. Sildenafil (ViagraTM), a potent and selective inhibitor of type 5 cGMP phosphodiesterase with utility for the treatment of male erectile dysfunction. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. v. 6, n. 15, p. 1819-1824, 1996.

TONINI, C. L. et al. Effects of aging and hypercholesterolemia on oxidative stress and DNA damage in bone marrow mononuclear cells in apolipoprotein E-deficient mice. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 14, p. 3325-3342. 2013.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of Physiology**. v. 552, p. 335-344, 2003.

URAO, N.; USHIO-FUKAI, M. Redox regulation of stem/progenitor cells and bone marrow niche. **Free Radical Biology Medicine**. v. 54, p.26-39, 2013.

USHIO-FUKAI, M.; REHMAN, J. Redox and metabolic regulation of stem/progenitor cells and their niche. **Antioxidants and Redox Signaling**. v. 21, n. 11. p. 1-4, 2014.

VALADARES, M. C.; CASTRO, N. C.; CUNHA, L. C. Synadenium umbellatum: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43, n. 4, out/dez, 2007.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 39, p. 44-84. 2007.

VASQUEZ, E. C. et al. Cardiac and vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse. **Journal of the Biomedical Science**. v. 19, n. 22, p. 1-9, 2012.

VON LEDEBUR, M.; SCHMID, W. The micronucleus test. Methodological aspects. **Mutation Research**. v. 19, p. 109-117. 1973.

WALLIS, R. M. et al. Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro. **The American Journal of Cardiology**. v. 83 (5A), p. 3C-12C, 1999.

WESSELY, R. Atherosclerosis and cell cycle: put the brakes on! **Journal of the American College of Cardiology**. v. 55, n. 20, p. 2269-2271, 2010.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Atlas on Cardiovascular Disease – Prevention and Control**. Geneva: [s.n.], 2012. Disponível em http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/atlas_cvd/en/. Acesso em 17 março 2013.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cardiovascular diseases (CVDs). Media Centre. World Health Statistics 2014. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. Acesso em 01/11/2015.

XIAO WANG, Z. et al. Mesenchymal stem cells alleviate atherosclerosis by elevating number and function of CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ regulatory T-cells and inhibiting macrophage foam cell formation. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 400, p. 163-172, 2015.

XIAO, Y. et al. Hydrogen peroxide inhibits proliferation and endothelial differentiation of bone marrow stem cells partially via reactive oxygen species generation. **Life Sciences**. v. 112, p. 33-40, 2014.

XU, B. et al. Calcium Signaling Is Involved in Cadmium-Induced Neuronal Apoptosis via Induction of Reactive Oxygen Species and Activation of MAPK/mTOR Network. **Plos One**. v. 6(4): e19052. 2011.

YANG, G. et al. The role of bone marrow cells in the phenotypic changes associated with diabetic nephropathy. **Plos One**. v. 10, n. 9, p. 1-13, 2015.

YILDIRIM, A. et al. Phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate in a rat model of bleomycin-induced lung fibrosis. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**. v. 23, n. 3, p. 215-221, 2010.

ZHAO, L. et al. Sildenafil Inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. **Circulation**. v. 104, p. 424-428, 2001.

ZUSMAN, R. M. et al. Overall cardiovascular profile of sildenafil citrate. **The American Journal of Cardiology**. v. 83 (5A), p. 35C-44C, 1999.